

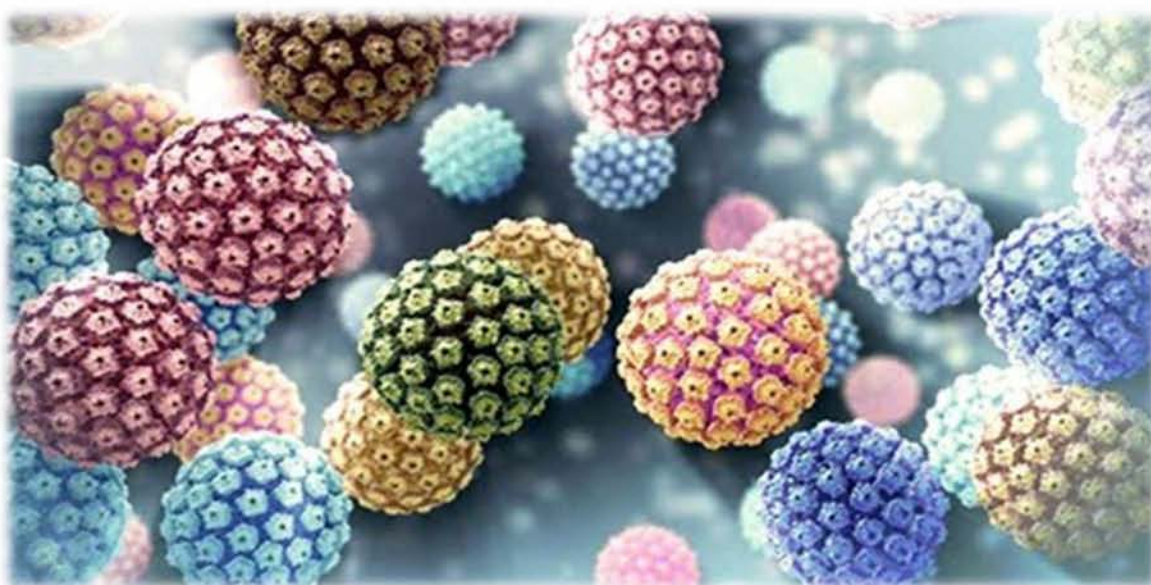


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Μελέτη

«Ανάπτυξη μιας ταχύτατης ισοθερμικής τεχνικής
LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) για την
ανίχνευση των ιών HPV-16»

«Development of a rapid Loop-Mediated Isothermal
Amplification assay (LAMP) for the detection of HPV-16
viruses»



Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Ζώτα Ιωάννα

Λάρισα 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (Ε.ΔΙ.Π.) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ.ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ:

ΣΥΜΒΑΣΙΟΥΧΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Οκτώβριο του 2016 έως τον Ιούνιο του 2017.

Αρχικά, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την βαθύτερη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου όσον αφορά στην ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, δίνοντάς μου την ευκαιρία να γνωρίσω τον κόσμο της ιολογίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της. Οι γνώσεις του και οι συμβουλές του πάνω στο αντικείμενο ήταν καθοριστικής σημασίας για μένα και θα με ακολουθούν συνέχεια στην περεταίρω σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα μέλος ΕΔΠ του τμήματος και τον κ. Τσακογιάννη Δημήτριο, συμβασιούχο διδασκων του τμήματος που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφεραν τόσο σε θεωρητικό όσο και εργαστηριακό επίπεδο.

Θα ήθελα ,ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τον διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Μοσχονά Γεώργιο , των οποίων η συμβολή συντέλεσε σημαντικά στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της εργασίας, βοηθώντας στο να ξεπεραστούν οποιαδήποτε εργαστηριακά προβλήματα. Ευχαριστώ ιδιαίτερως τη φίλη και συνάδελφό μου Γκιουζέλη Χριστίνα για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου - Μαρία, Κώστα και Φώτη - για τη βοήθεια τους αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γεώργιο και Παναγιώτα και την αδελφή μου Αλεξάνδρα για την συμπαράστασή τους καθώς και για τις θυσίες που έκαναν τόσα χρόνια προσφέροντάς μου όλα τα απαραίτητα αγαθά, υλικά και ψυχικά, για τη πραγματοποίηση των σπουδών μου και την υλοποίηση των στόχων μου. Η συγκεκριμένη εργασία είναι αφιερωμένη, εξολοκλήρου, σε αυτούς.

Abstract

Human papilloma viruses were discovered by Francis Peyton Rous in the early 20th century and they belong to the family of papillomaviridae. They are double-stranded circular viruses of 7900 bp in size, lacking an outer shell. They attack the basal epithelium of the skin, and the mucus, and cause a variety of lesions ranging from common warts to cervical neoplasms and cancer.

Human Papilloma Viruses (HPVs) are transmitted through skin contact and are responsible for causing various intraepithelial lesions. Most of HPV infections have no symptoms. Today, more than 150 HPV genotypes have been fully sequenced with distinct HPV genotypes, having different life cycle characteristics and oncogenic activity. One in three of the virus types are transmitted through sexual contact and infect the urogenital system. Epidemiological and experimental studies have shown that certain types of HPV viruses (HPV-High Risk) are a major cause of cervical cancer, while other types of HPV viruses (HPV-Low-Risk) cause common genital warts. Specifically, it has been proved that HPVs are responsible for about 60% of the cases of cervical cancer. It is also significant the fact that although the use of cytology tests has reduced the incidence of the disease in Western countries, rates of clinical cases remain high.

As a result, the rapid detection and identification of HPV viruses is of vital importance according to the research for the timely and valid diagnosis of infection. In order to achieve this goal, many laboratories around the world are working on developing new methods or improving the existing ones, so that the virus can be detected before clinical symptoms (warts-cancer) occur.

In the present study, a fast, easy, high-sensitivity and specific isothermal amplification (LAMP) was developed to detect HPV-16 viruses. The results of the method applied to both cell lines carrying HPV 16 genomes and in clinical specimens proved that this technique may be used as an appropriate diagnostic tool for detecting HPV-16 viruses.

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (papillomaviruses) ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από τον Francis Peyton Rous και ανήκουν στην οικογένεια των papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί ιοί μεγέθους 7900 bp, που στερούνται εξωτερικού περιβλήματος. Προσβάλλουν το βασικό επιθήλιο του δέρματος, και του βλεννογόνου, και προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων, που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, μέχρι νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο.

Ο Ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV) μεταδίδεται μέσω δερματικής επαφής και είναι υπεύθυνος για την πρόκληση ποικίλων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωτικές. Σήμερα, περισσότεροι από 150 γονότυποι HPV έχουν πλήρως αλληλουχηθεί με τους διακριτούς γονότυπους HPV να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά κύκλου ζωής και ογκογόνο δράση. Το ένα τρίτο των τύπων του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλει το ουρογεννητικό σύστημα. Μέσω επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών έχει αποδειχθεί ότι ορισμένοι τύποι των HPV ιών (HPV-υψηλού κινδύνου) αποτελούν βασική αιτία πρόκλησης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ κάποιοι άλλοι τύποι HPV ιών (HPV- χαμηλού κινδύνου) προκαλούν κοινά κονδυλώματα του γενετικού συστήματος. Συγκεκριμένα ο τύπος HPV-16 έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για το 60% περίπου των περιπτώσεων πρόκλησης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι παρόλο που η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά των κλινικών εκδηλώσεων παραμένουν αρκετά υψηλά.

Εξαιτίας του γεγονότος αυτού η γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV ιών αποκτά μεγάλη ερευνητική σημασία για την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της μόλυνσης. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο στόχος πολλά εργαστήρια παγκοσμίως ασχολούνται με την ανάπτυξη νέων μεθόδων ή την βελτίωση των ήδη υπαρχόντων, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του ιού πριν ακόμα εκδηλωθούν τα κλινικά συμπτώματα (κονδυλώματα-καρκίνος).

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μία γρήγορη, εύκολη, υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης ισοθερμική τεχνική (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) για την ανίχνευση των ιών HPV-16. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου τόσο σε πρότυπα στελέχη όσο και σε κλινικά δείγματα, καθιστούν αυτή την τεχνική κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των ιών HPV-16.

Περιεχόμενα

<i>Κεφάλαιο 1ο</i>	<i>9</i>
Εισαγωγή	9
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.2. Ιστορική αναδρομή	10
1.3. Ταξινόμηση των papilloma ιών	12
1.3.1. Alpha-papillomavirus	14
1.3.2. Beta-papillomavirus	15
1.3.3. Gamma, Mu, Nu Papillomavirus	15
1.4. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs)	17
1.4.1. Δομή του ιϊκού καψιδίου	17
1.4.1.1. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1	18
1.4.1.2. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2	19
1.4.2. Οργάνωση του Γονιδιώματος	20
1.4.2.1. Η ιική πρωτεΐνη E1	21
1.4.2.2. Η ιική πρωτεΐνη E2	24
1.4.2.3. Η ιική πρωτεΐνη E4	26
1.4.2.4. Η ιική πρωτεΐνη E5	27
1.4.2.5. Η ιική πρωτεΐνη E6	29
1.4.2.6. Η ιική πρωτεΐνη E7	32
1.5 Η μορφή του γονιδιώματος των HPV	35
1.6. Θέσεις ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή	36
1.7. Ο κύκλος ζωής των HPV ιών	37
1.7.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή	37
1.7.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος	39
1.7.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος	40
1.7.4. Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση	41
1.8. Ιστολογικές αλλοιώσεις	42
1.9 Κλινικά συμπτώματα	43
1.10. Επιδημιολογία	45
1.11 Εμβόλια έναντι του HPV ιού	45

1.12. Εργαστηριακή διάγνωση	46
1.12.1. Pap test	47
1.12.2. Hybrid Capture- II	47
1.13. Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	48
1.13.1. PCR σε συνδυασμό με Microarrays	48
1.13.2 Real time PCR	48
1.13.3 Nested Multiplex PCR	49
1.14. Σκοπός	50
<i>Κεφάλαιο 2^ο</i>	51
Υλικά και Μέθοδοι	51
2.1. Κλινικά δείγματα	51
2.2. Εκχύλιση DNA	55
2.2.1. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep	55
2.2.2. Εκχύλιση DNA από μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη	55
2.3 Ταυτοποίηση των δειγμάτων	56
2.4. Σχεδιασμός των εκκινητών	57
2.5. LAMP (Loop mediated isothermal amplification)	58
2.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP	61
2.7. Ενίσχυση των E6-E7 γονιδίων με PCR	61
2.8. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	63
2.9. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR (agarose extraction)	64
2.10. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR	64
2.11. Αραιώσεις πλασμιδίων	66
2.12. Real-time PCR	67
2.13. Τελικός έλεγχος κλινικών δειγμάτων με PCR	67
<i>Κεφάλαιο 3^ο</i>	69
Αποτελέσματα	69
3.1.Αποτελέσματα της LAMP στα πρότυπα στελέχη	69
3.2. Αποτελέσματα της LAMP στα κλινικά δείγματα	70
3.2. Αποτελέσματα της PCR στα κλινικά δείγματα για τα γονίδια E6 και L1	71
3.3. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων	72

3.4. Εύρεση αριθμού αντιγράφων με Real time PCR	75
<hr/>	
3.5. Προσδιορισμός της ευαισθησίας της μεθόδου LAMP	76
<hr/>	
3.6. Προσδιορισμός αντιγράφων των δειγμάτων με αρνητικό αποτέλεσμα στη LAMP	76
<hr/>	
Κεφάλαιο 4^ο	78
Συζήτηση	78
Κεφάλαιο 5^ο	82
Βιβλιογραφία	82

Κεφάλαιο 1ο

Εισαγωγή

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae και η ονομασία τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Οι Papillomaviridae είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp, που στερούνται εξωτερικού περιβλήματος. Σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV) εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV) και οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι [1,2].

Ο ιός HPV μολύνει τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του τραχηλικού επιθηλίου και ανιχνεύεται τόσο σε κονδυλώματα όσο και σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Μάλιστα, η εμπλοκή του HPV στην καρκινογένεση του κατώτατου γεννητικού συστήματος, αλλά και του δέρματος, του λάρυγγα, του φάρυγγα, της ουροδόχου κύστης και των πνευμόνων ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για ένα ισχυρό καρκινογόνο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί το γεγονός ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου που συναντάται στο γυναικείο φύλο παγκοσμίως [3,4].

Οι HPV ιοί διαχωρίζονται με βάση τον τροπισμό τους σε εκείνους που προσβάλλουν το δέρμα και εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες (πίνακας 1). Αυτές απαρτίζονται από την ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση «επεκτατικού» καρκίνου συνήθως του ουρογεννητικού συστήματος, την ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και τέλος την ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk) τα μέλη της οποίας εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων [5]. Επίσης, κάθε τύπος του ιού καθορίζεται από έναν αριθμό που αντιπροσωπεύει τη σειρά με την οποία ανακαλύφθηκε. Στον γενικό πληθυσμό, πιο συχνά ανευρίσκονται, με φθίνουσα σειρά, οι τύποι: 16, 18, 45, 31, 6, 58, 35, 33, ενώ σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου, ανευρίσκονται, πάλι με φθίνουσα σειρά, οι τύποι: 16, 18, 45, 31, 33, 52,

58, 35. Από τους τύπους υψηλού κινδύνου, οι HPV-16, HPV-18 και HPV-31 έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό που αγγίζει το 95% [6,7]. Οι επιδημιολογικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι ο συχνότερα προσδιορισμένος γονότυπος HR-HPV είναι ο HPV16, ο οποίος ακολουθείται από τον HPV18 και περίπου 70% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας προκαλούνται από αυτούς τους δύο γονότυπους.

Ομάδες Επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Πίνακας 1.1.: Κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων των ιών HPV με βάση το βαθμό επικινδυνότητάς τους.

1.2. Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά στον όρο «γεννητικά κονδυλώματα» πραγματοποιείται το 460 π.Χ. και το 25 μ.Χ. διαχωρίζονται σε τρεις διαφορετικούς τύπους [9]. Το 1842 χρησιμοποιήθηκε ο όρος «αφροδίσια φύση» όσον αφορά στην πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου [10] και το 1891 ο χαρακτηρισμός «λοιμογόνος φύση» για την περιγραφή των κοινών κονδυλωμάτων [9]. Έπειτα, το 1907 στην Ιταλία, δημοσιεύονται οι παρατηρήσεις του Ciuffo για την δημιουργία θηλωμάτων στον άνθρωπο μετά από ενδοδερμική ένεση μολυσμένων εκχυλισμάτων που είχαν απαλλαγεί από κύτταρα. Έτσι επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη μολυσματικού παράγοντα που προκαλεί τα θηλώματα [10]. Η ανακάλυψή όμως των HPV ιών αποδίδεται στον Francis Peyton Rous, ο οποίος το 1935, αφού είχε αποδείξει πρόσφατα την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Συγκεκριμένα, παρατήρησε ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Το 1949 εντοπίστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σωματίδια του ιού σε κλινικό δείγμα

ανθρώπων θηλωμάτων από τον Strauss. Την ίδια χρονιά, ο Ayre περιέγραψε τις κυτταρολογικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από τους ιούς σε κολπικά επιχρίσματα [10].

Ορόσημο για την περεταίρω μελέτη των HPV ιών, κατά τις δεκαετίες 1950-60, αποτελεί η απόδειξη ότι η αντιγραφή του ιού σχετίζεται με τη διαδικασία διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων που ο ιός μολύνει. Η μοριακή κλωνοποίηση επέτρεψε στους επιστήμονες να κλωνοποιήσουν τα γονιδιώματα των papillomaviruses με αποτέλεσμα να ενισχυθεί το ενδιαφέρον για τη μελέτη των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των ιών αυτών. Η αλληλούχιση στη συνέχεια επέτρεψε τον προσδιορισμό των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) που προέρχονται από γονίδια του ιού και η αντίστροφη γενετική κατέστησε δυνατό τον καθορισμό της λειτουργίας των γονιδίων του ιού [8].

Με τη συμβολή των παραπάνω τεχνικών που αναπτύχθηκαν, το 1965 περιγράφηκαν για πρώτη φορά δομικά και μοριακά χαρακτηριστικά του ιού [9]. Το 1976-77 οι Gissman και zur Hausen ανακαλύπτουν ότι υπάρχουν περισσότεροι από ένας τύποι του HPV, ενώ την ίδια χρονιά ο τελευταίος δημοσίευσε την υπόθεση ότι ο HPV ιός κατέχει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [10]. Την υπόθεση αυτή επιβεβαίωσαν το 1978 οι Jabłońska και Gerard Orth, όταν απομόνωσαν το DNA του HPV-5 από καρκινικά επιδερμικά κύτταρα. Επιπλέον, η Jabłońska παρατήρησε ότι οι ασθενείς που εμφάνιζαν κονδυλώματα σε σημεία τα οποία εκτίθονταν στην ηλιακή ακτινοβολία, μετέπειτα μετατρέπονταν σε όγκους του πλακώδους επιθηλίου. Αργότερα, το 1983-1984, ο Harald zur Hausen μαζί με τους συνεργάτες του, απομόνωσαν τα πρώτα στελέχη HPV-16 και HPV-18 από καρκινικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας [11]. Έναν χρόνο μετά δημοσιεύτηκαν από τους Schwartz και Yee οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του HPV στα χρωμοσώματα του ξενιστή σε περιπτώσεις πρόκλησης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Την ίδια χρονιά, προκαλούνται κονδυλωματώδεις αλλοιώσεις *in vivo* σε ποντίκια, με μεταμόσχευση καρκινικών κυττάρων μολυσμένων με HPV-11, από τον Kreider. Ακολούθως, το 1987, παρατηρήθηκε ότι τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα που έχουν προσβληθεί από το στέλεχος HPV-16 αθανатоποιούνται [10]. Τον επόμενο χρόνο ο Von Knebel Doeberitz και οι συνεργάτες του ενοχοποιούν τις περιοχές E6 και E7 του γονιδιώματος του ιού για την πρόκληση κακοήθειας. Στη συνέχεια, ο Dyson και οι

συνεργάτες του, το 1989, κάνουν λόγο για την τροποποίηση και την εξουδετέρωση της πρωτεΐνης Rb του κυττάρου ξενιστή από το προϊόν της περιοχής E7 του γονιδιώματος του ιού. Την επόμενη χρονιά, ο Werness και οι συνεργάτες του ανακαλύπτουν την δέσμευση της πρωτεΐνης p53 του κυττάρου ξενιστή από το προϊόν της περιοχής E6 του γονιδιώματος του ιού. Έπειτα από την ανακάλυψη όλων των παραπάνω, το 2006 εγκρίνεται στις ΗΠΑ το πρώτο εμβόλιο για την πρόληψη της μόλυνσης από τον ιό, το οποίο περιέχει τέσσερις τύπους του HPV- 6,11,16 και 18 και χορηγείται μέχρι και σήμερα σε νεαρές γυναίκες [12].

1.3. Ταξινόμηση των papilloma ιών

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά είχαν ομαδοποιηθεί μαζί με τους polyoma ιούς και τον ιό SV40 σε μια μεγάλη ενιαία οικογένεια, αυτήν των Papovaviridae. Η συγκεκριμένη ταξινόμηση βασίστηκε σε ομοιότητες στην δομή των καψιδίων των ιών αυτών, οι οποίοι στερούνταν εξωτερικού περιβλήματος, καθώς και στο γεγονός ότι διέθεταν παρόμοιο δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA [13]. Αργότερα, όμως, αναγνωρίστηκε ότι οι papillomaviruses διέφεραν σε μεγάλο βαθμό από την οικογένεια των papovaviridae καθώς ανακαλύφθηκε ότι έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, εντελώς διαφορετική γενωμική οργάνωση αλλά και ότι οι νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες τους δεν παρουσίαζαν σημαντική ομολογία. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν το 2002 στο να ταξινομηθούν οι παραπάνω ιοί, από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV), σε δυο διαφορετικές διακριτές οικογένειες. Αυτές αποτελούνται από την οικογένεια των Papillomaviridae, η οποία περιλαμβάνει όλους τους ιούς των θηλωμάτων (papillomaviruses) και την οικογένεια των Polyomaviridae που περιλαμβάνει τους polyomaviruses [2].

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε οροτύπους λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμες κυτταρικές σειρές διαφοροποιούμενων επιθηλιακών κυττάρων ώστε να καλλιεργηθούν. Συνεπώς, η ταξινόμηση των διαφόρων ιικών τύπων πραγματοποιείται βάσει της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενωμάτων [14]. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η αλληλουχία του γονιδίου L1 του ιού, η οποία είναι σχετικά συντηρημένη και κωδικοποιεί για την

καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού. Βάσει της ομοιότητας της αλληλουχίας του γονιδίου L1, γίνεται ο διαχωρισμός των ιών σε γένη, τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants). Κάθε νέος papilloma ιός που απομονώνεται αποτελεί διαφορετικό τύπο, αν η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από το γονίδιο L1 του κοντινότερου γνωστού τύπου περισσότερο από 10%. Διαφορές μεταξύ 2% και 10% υποδηλώνουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορές λιγότερο από 2% υποδηλώνουν μια παραλλαγή (variant) [2,15].

Οι ιοί των θηλωμάτων ταξινομούνται σε 16 γένη, τα οποία παρουσιάζουν 60% ομολογία στην αλληλουχία του L1 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και το όνομα του κάθε γένους προέρχεται από το ελληνικό αλφάβητο (από Άλφα έως Ρι). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιλαμβάνουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Lamda, Xi, Pi, κ.α) περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών [15,17,18]. Τα δυο κύρια γένη HPV είναι οι Alpha και Beta Papillomaviruses, στα οποία ανήκει περίπου το 90% των χαρακτηρισμένων HPV. Αξιοσημείωτο είναι ,επίσης, το γεγονός ότι ανάλογα με το γένος στο οποίο ανήκει ο κάθε ιός προκαλεί διαφορετικό βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και διακρίνεται από διαφορετικά χαρακτηριστικά κύκλου ζωής [16,19].

Όσον αφορά στον ιστικό τροπισμό και στη συσχέτιση των HPV ιών, μπορούν να μελετηθούν με φυλογενετικά δένδρα που δημιουργούνται από υπολογιστικούς αλγόριθμους ευθυγράμμισης αλληλουχιών. Οι δερματικοί υπότυποι σχηματίζουν ένα διακριτό κλάδο, ενώ οι γεννητικοί υπότυποι με υψηλό κακοήθες δυναμικό σχηματίζουν ένα δεύτερο κλάδο. Οι φυλογενετικές μελέτες υποδεικνύουν πως οι ιοί συνήθως εξελίσσονται μαζί με τα θηλαστικά και πτηνά που προσβάλλουν, δεν αλλάζουν είδος ξενιστή, δεν επανασυνδέονται, και διατηρούν τη βασική οργάνωση του γονιδιώματός τους για χρονικό διάστημα που υπερβαίνει τα 100 εκατομμύρια χρόνια [12].

Risk-HPV ιών, έχει παρατηρηθεί ότι ανευρίσκεται σε ποσοστό 60% περίπου των περιπτώσεων εκδήλωσης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [6]. Οι υπόλοιποι τύποι του γένους αυτού χαρακτηρίζονται ως ενδιάμεσης ή χαμηλής επικινδυνότητας με βάση τη συχνότητα εμφάνισής τους σε περιπτώσεις καρκινικών αλλοιώσεων. Βέβαια, παρόλο που οι ιοί χαμηλής επικινδυνότητας εντοπίζονται σπάνια σε καρκινικές αλλοιώσεις, παρουσιάζουν ερευνητικό και διαγνωστικό ενδιαφέρον καθώς είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση των θηλωμάτων του ουρογεννητικού συστήματος [18]. Εκτός από τους παραπάνω τύπους, όμως, στο γένος αυτό συμπεριλαμβάνονται και κάποιοι ιοί που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου.

1.3.2. Beta-papillomavirus

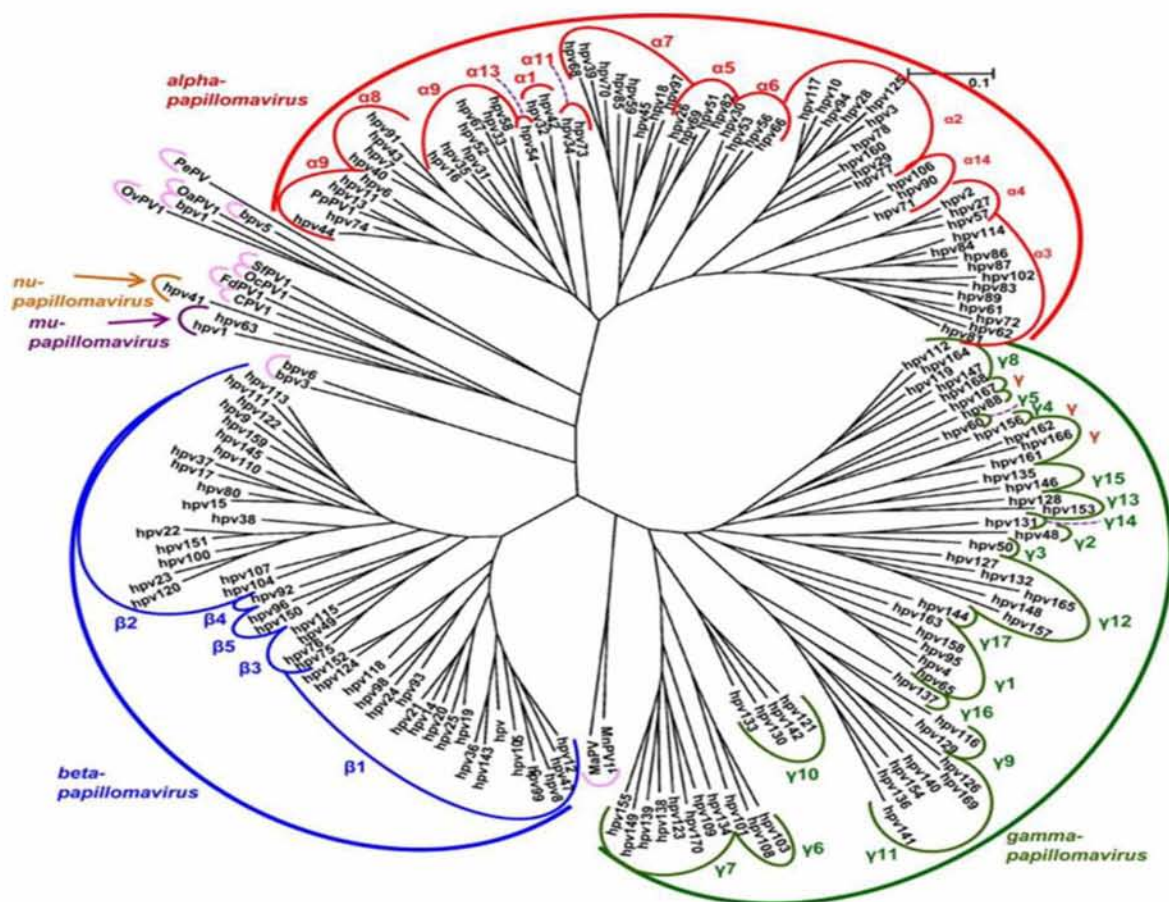
Το γένος των Beta-papillomaviruses περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στελέχη, τα οποία προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος χωρίς να προκαλούν αλλοιώσεις. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis) η μόλυνση από τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους μπορεί να εξελιχθεί σε μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος [20]. Συγκεκριμένα, τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 παρουσιάζονται στο 90% αυτών των όγκων [21].

1.3.3. Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Οι ιοί αυτοί συχνά εντοπίζονται σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Τα τρία αυτά γένη προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.2) περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu papillomaviruses [18].

Γένος	Στέλεχος
Beta papillomavirus	HPV- 2, 5, 8, 107
Gamma Papillomavirus	HPV- 101, 103
Mu Papillomavirus	HPV- 1, 63
Nu Papillomavirus	HPV- 41

Πίνακας 1.2.: Συνοπτική αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.



Εικόνα 1.2 : Απεικόνιση φυλογενετικού δέντρου των Papilloma ιών όπου δίνεται έμφαση στα γένη που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε βάσει των αλληλουχιών του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου L1 και κατασκευάστηκε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας με τη χρήση του προγράμματος MEGA5.1 [22].

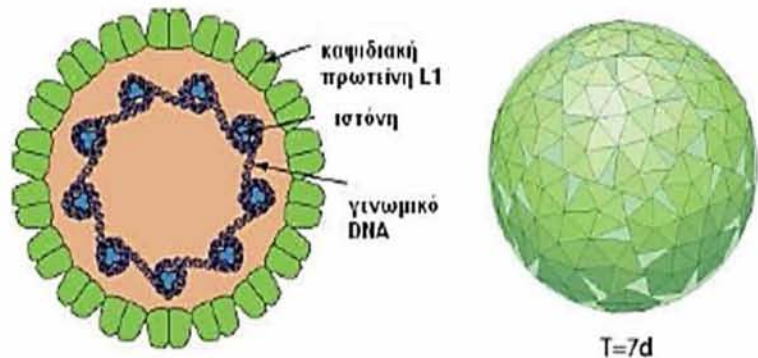
1.4. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs)

1.4.1. Δομή του ιϊκού καψιδίου

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων είναι μικροί, κυκλικοί, DNA ιοί μεγέθους 7900 βάσεων με διάμετρο της τάξης των 55-60nm, οι οποίοι δεν περιβάλλονται από εξωτερικό περίβλημα [7]. Το γονιδιώμά τους εσωκλείεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής δομής το οποίο αποτελείται από 360 αντίγραφα της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 οργανωμένα σε 72 πενταμερή (καψομερίδια)

και χαρακτηρίζεται από triangulation number $T=7$ [23].

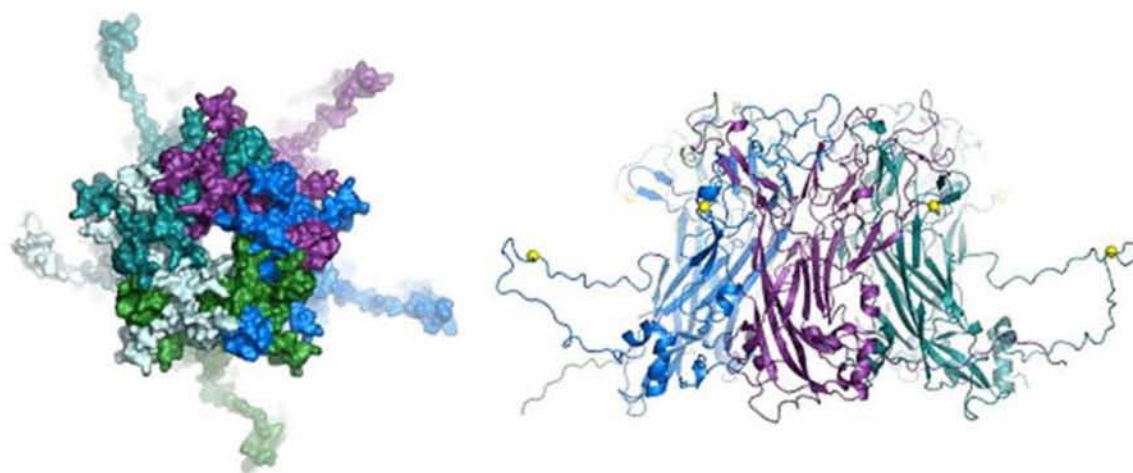
Τόσο η πρωτεΐνη L1 όσο και η πρωτεΐνη L2, οι δύο υπεύθυνες πρωτεΐνες για το σχηματισμό του καψιδίου, εκφράζονται κατά την όψιμη φάση του



κύκλου ζωής του ιού [24]. Η πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλλει στην αναγνώριση των ιικών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου [25,26]. Η πρωτεΐνη L2, η οποία παράγεται σε μικρότερες ποσότητες από την L1, τοποθετείται εσωτερικά του καψιδίου που σχηματίζεται από τα L1 πενταμερή. Πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται στο C-τελικό της άκρο. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1, αλλά ο δομικός της ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη [27]. Κύριος ρόλος της πρωτεΐνης L2 είναι το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσυντιθέμενα ιικά σωματίδια σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2 [28]. Επίσης, στο εσωτερικό του καψιδίου εντοπίζονται κυτταρικές ιστόνες, οι οποίες συμπυκνώνουν το γονιδιώμα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA «μίνι-χρωμόσωμα» [29].

1.4.1.1. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 αποτελεί τη μείζονα πρωτεΐνη του καψιδίου, έχει μοριακό βάρος 55kDa και συνθέτει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου. Ο ρόλος της έγκειται στη συμβολή της τόσο στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή όσο και στην απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή [30]. Η εξωτερική επιφάνεια των ιοσωματίων φέρει 72 πλαϊνές προεξοχές που συντίθενται από πενταμερή της πρωτεΐνης L1. Το N-τελικό και το C-τελικό άκρο της L1 διευθετούνται ως προεξέχουσες θηλιές, οι οποίες σχηματίζουν τον χώρο μεταξύ των πενταμερών (Εικόνα 1.3.). Μεταξύ των γειτονικών πενταμερών δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός, ο οποίος προσδίδει σταθερότητα στο καψίδιο [31, 32, 33].



Εικόνα 1.3 : Δομή ενός L1 πενταμερούς. Καθεμία L1 αλυσίδα παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα. Στην αριστερή πλευρά της εικόνας απεικονίζεται η κατακόρυφη όψη ενός L1 πενταμερούς και διακρίνονται ξεκάθαρα οι αλληλοεμπλεκόμενες θηλιές των L1 πενταμερών. Στην δεξιά πλευρά της εικόνας παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο γειτονικών πενταμερών όπου οι δισουλφιδικοί δεσμοί απεικονίζονται ως κίτρινες σφαίρες [33].

Όπως προαναφέρθηκε, το ιικό καψίδιο συντίθεται από 72 πενταμερή της πρωτεΐνης L1 με την συμβολή 12 ή περισσότερων αντιγράφων της πρωτεΐνης L2. Τα πενταμερή της κύριας όψιμης πρωτεΐνης, L1, έχουν την ικανότητα να αυτό-συναρμολογούνται αυθόρμητα σε άδεια καψίδια τα οποία σταθεροποιούνται με ισχυρούς δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών L1 μορίων. Τα τελευταία αναφέρονται ως VLPs (Virus Like Particles). Τα VLPs είναι μορφολογικά και ανοσολογικά όμοια με τους

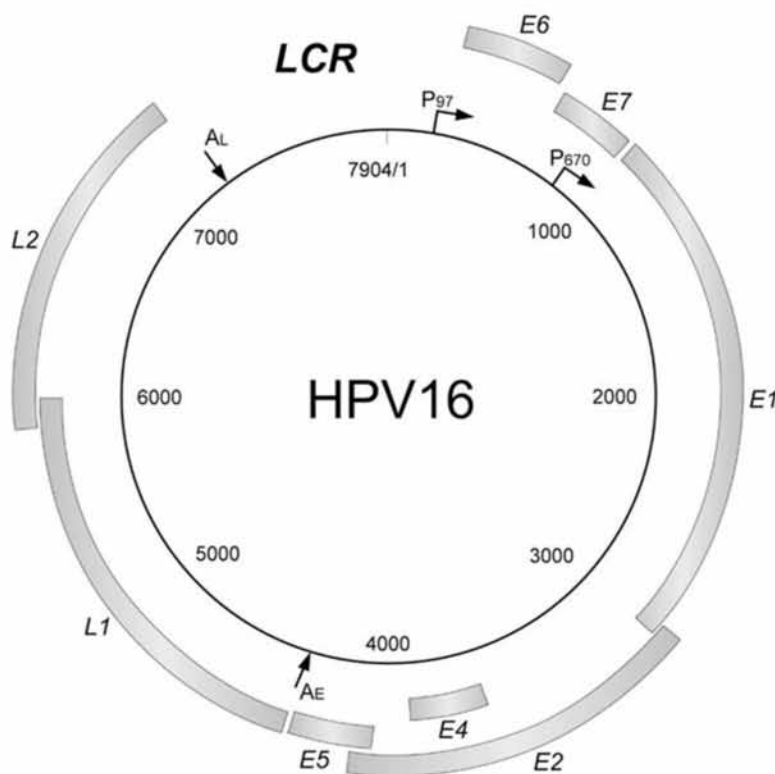
μολυσματικούς ιούς, όπως προκύπτει από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και από την δυνατότητά τους να συνδέονται με μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία εξαρτώνται από την χωροδιάταξη [34]. Επιπρόσθετα, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου L1 είναι ιδιαίτερα συντηρημένο. Έτσι, εμβόλια που περιέχουν VLPs τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη L1 από διάφορους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας, έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά ενάντια σε μολύνσεις από τον ιό.

1.4.1.2. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2

Η L2 αποτελεί την ελάχιστο καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού, έχει μοριακό βάρος 55 kDa, με 12 αντίγραφα ανά ιοσωμάτιο και εκφράζεται μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα του ξενιστή. Εντοπίζεται εσωτερικά του σκελετού της L1 και εξέρχεται του καψιδίου κατά την διαδικασία της εισόδου του ιού στο κύτταρο [35,36]. Σε αντίθεση με την L1, η πρωτεΐνη L2 αδυνατεί να αυτό-συγκροτηθεί ώστε να δημιουργήσει κενά ιοσωμάτια (virus-like particles, VLPs) [37]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται με την πρωτεΐνη L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της. Ως αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης η L2 εισέρχεται στο κέντρο του L1 πενταμερούς [27]. Όσον αφορά στις λειτουργίες της, η L2 συμμετέχει σε διάφορες σημαντικές διεργασίες, όπως είναι η είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, η απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω της εμπλοκής της στη διαδικασία καταστροφής των ενδοσωμικών κυστιδίων, καθώς και η μετακίνηση των ιικών σωματιδίων στα κατάλληλα κυτταρικά όργανα [38]. Η βασικότερη λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις ικές πρωτεΐνες L1 και E2 κατά τη συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων [39,40,41,42].

1.4.2. Οργάνωση του Γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων αποτελείται από δίκλωνο κυκλικό DNA μήκους 7.904bp. Η οργάνωση του γενώματος είναι αρκετά συντηρημένη ανάμεσα στους HPVs και στους ιούς των θηλωμάτων των ζώων. Όπως προαναφέρθηκε, το DNA του ιού βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες στο εσωτερικό του ιικού σωματίου, σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με χρωμόσωμα. Το γένωμα των papilloma ιών περιλαμβάνει οκτώ ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs), τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNAs που προέρχονται από την ίδια αλυσίδα DNA και αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: την ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region), την πρώιμη περιοχή E (Early) και την όψιμη περιοχή L (Late).



Εικόνα 1.4: Αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος του ιού HPV-16 [24].

Η ρυθμιστική περιοχή LCR εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L1 και πριν την αρχή του γονιδίου E6 και καταλαμβάνει ένα τμήμα περίπου 850 bp (10% του γονιδιώματος του HPV ιού). Η LCR δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) και συνεπώς δεν κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη. Ωστόσο, η περιοχή αυτή περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και πολλαπλές θέσεις δέσμησης σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. SP1, AP1, Oct1), οι οποίες

είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της έκφρασης τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων γονιδίων από την RNA πολυμεράση II [7,24,42,43,44].

Η πρώιμη περιοχή (Early Region) καταλαμβάνει πάνω από το 50% του ιικού γονιδιώματος και είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του ιού, συμπεριλαμβανομένων των ιικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την έναρξη της ιικής αντιγραφής. Διακρίνεται σε έξι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs): E1, E2, E4, E5, E6 και E7, τα οποία κωδικοποιούν τις ομόνυμες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Επίσης, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων [13].

Η όψιμη περιοχή αντιστοιχεί στο 40% περίπου του γενώματος του ιού, βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής και περιλαμβάνει δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, το L1 και το L2 από τα οποία προκύπτουν οι δομικές καψιδιακές πρωτεΐνες, που εκφράζονται μόνο στα παραγωγικά μολυσμένα κύτταρα [45].

Η έκφραση του γενώματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Ο ένας από αυτούς είναι ο υποκινητής PE (early promoter, ή αλλιώς p97), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και δεύτερος είναι ο υποκινητής PL (late promoter, ή αλλιώς p670), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων. Στην εικόνα 1.4. παρουσιάζονται οι ανωτέρω υποκινητές στις θέσεις 97 και 670. Οι περιοχές που επισημαίνονται ως AE και AL υποδηλώνουν τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης αντίστοιχα. [7,24,46].

1.4.2.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Παρουσιάζει μια εκτεταμένη ομολογία ,αμινοξική και λειτουργική, με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού [48,49]. Κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στο γονιδίωμα των HPVs το μέγεθος του οποίου κυμαίνεται μεταξύ 600-650 αμινοξέων ανάλογα με τον τύπο του ιού [47]. Αποτελεί την πιο συντηρημένη πρωτεΐνη των HPV ιών, γεγονός

που αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στον κύκλο ζωής του ιού [50]. Εμφανίζει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA καθώς και θέση πρόσδεσης για την περιοχή έναρξης της αντιγραφής που βρίσκεται στη ρυθμιστική περιοχή LCR, οπότε η παρουσία της κρίνεται απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού επισώματος στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων. Ακόμη, η πρωτεΐνη E1 εμφανίζει δραστικότητα ATPάσης, ελικάσης και έχει, επίσης, την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E2 και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α [51].

Όσον αφορά στη δομή της η πρωτεΐνη E1 αποτελείται από τρία κύρια λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.5.): α) Μία N-τελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αντιγραφή του ιού [52,53] β) Μία κεντρική περιοχή που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής [54,55,56] και γ) Μία C-τελική ενζυμική περιοχή, ικανή για αυτοσυγκρότηση σε εξαμερή, η οποία έχει δραστικότητα ATPάσης και συμβάλλει στο ξετύλιγμα μικρών δίκλωνων τμημάτων DNA [57,58,59].



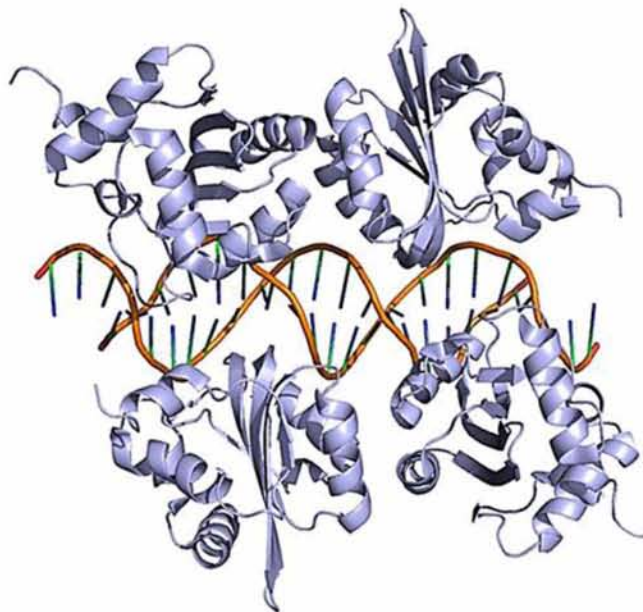
Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E1 του BPV-1. Απεικονίζονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα από αριστερά προς τα δεξιά είναι: το N-τελικό άκρο με τη ρυθμιστική περιοχή, η DNA-binding περιοχή και η περιοχή της ATPάσης (με δραστικότητα DNA ελικάσης) [50].

Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης E1, μήκους περίπου 200 αμινοξέων, αποτελεί μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των στελεχών του HPV. Έχει ανακαλυφθεί ότι η περιοχή που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο ενισχύει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρείται το ιικό DNA στην επισωματική του μορφή, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση αυτής μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών [60,61].

Η δραστικότητα της ATPάσης εντοπίζεται στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E1 συμβάλλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές

[62]. Η περιοχή αυτή είναι επίσης υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του κυττάρου ξενιστή [63]

Βασικός ρόλος της ιικής E1 πρωτεΐνης είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων των ιικών επισωμάτων κατά τη μόλυνση των βασικών κερατινοκυττάρων. Με άλλα λόγια, είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ιικό DNA στην επισωματική του μορφή [50]. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ATP, η E1 αναγνωρίζει και προσδένεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, *ori*), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων. Στη συνέχεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, συγκροτεί ένα διπλό εξαμερές (Εικόνα 1.6.), το οποίο διαθέτει δραστηριότητα ελικάσης και βοηθά στο ξετύλιγμα του DNA στην θέση *ori* και στην δημιουργία της αντιγραφικής διχάλας [50,64,65,67].



Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη E1 προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής παράγοντας αντιγραφής [54]. Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα E2 διμερές και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν δομική μονάδα για την συγκρότηση ενός μεγαλύτερου E1 εξαμερούς συμπλόκου, που έχει την ικανότητα να ξετυλίγει το DNA [68]. Συνεπώς, η πρωτεΐνη E2 λειτουργεί ως παράγοντας που κατευθύνει την πρωτεΐνη E1 στην περιοχή πρόσδεσής της καθώς και ως παράγοντας που συναρμολογεί τα E1 μονομερή [69].

Εικόνα 1.6 : Κρυσταλλική δομή δύο DBD διμερών, προσδεδεμένα στο DNA. Απεικόνιση του τρόπου συγκρότησης του διμερούς και του τρόπου πρόσδεσής του στο DNA [66].

Λόγω του καθοριστικού ρόλου της στην αντιγραφή και την παθογένεια του ιού, η πρωτεΐνη E1 αποτελεί ένα ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη αντι-HPV φαρμάκων [70].

1.4.2.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 αποτελεί μια απαραίτητη ρυθμιστική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς. Έχει μέγεθος περίπου 50 kDa , αποτελείται από 360 περίπου αμινοξέα και είναι διμερής [71]. Έχει την ικανότητα να προσδένεται σε συγκεκριμένες θέσεις ,μήκους 12bp, στο ιικό γονιδίωμα οι οποίες τοποθετούνται εντός της ρυθμιστικής περιοχής LCR. Πρόκειται για μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, που εμπλέκεται σε αρκετές διαδικασίες και κυρίως σε όσες σχετίζονται με την μεταγραφή και την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η έκφρασή της λαμβάνει χώρα στα πρώιμα και τα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού [72].

Δομικά αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Το αμινοτελικό της άκρο αποτελείται από μια περιοχή μήκους περίπου 200 αμινοξέων, η οποία αποτελεί μια περιοχή trans- ενεργοποίησης (transactivation domain, TAD) και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες του κυττάρου-ξενιστή (Brd4, Sp1,TFIIB,AMF1), εμπλέκεται δηλαδή στην ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων, και επιπλέον εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1. Η αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης E2 έχει βρεθεί ότι σχηματίζει δομή α-έλικας. Το καρβοξυτελικό άκρο της περιλαμβάνει μία περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό DNA και τον διμερισμό της E1 (DNA-binding/dimerization domain, DBD). Η συγκεκριμένη περιοχή έχει κρυσταλλοποιηθεί και φαίνεται να σχηματίζεται από μία διμερή μορφή β-βαρελιού που προσδένεται στο DNA. Ανάμεσα στις δύο αυτές περιοχές υπάρχει μία περιοχή “άρθρωσης” (hinge), η οποία σχηματίζει έναν εύκαμπτο άξονα [73,74,75,76]. Η N-τελική και C-τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPVs, ενώ η περιοχή hinge παρουσιάζει μεγαλύτερη ετερογένεια [77].



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E2, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Η περιοχή μεταξύ των δύο κύριων λειτουργικών τμημάτων ονομάζεται «άρθρωση» και ποικίλλει σε μήκος μεταξύ των Papilloma ιών [72].

Ο κύριος ρόλος της ιικής πρωτεΐνης E2 είναι η ρύθμιση της μεταγραφής των Papilloma ιών [78,79,80]. Η E2 δρα στρατολογώντας κυτταρικούς παράγοντες στο ιικό γονιδίωμα, οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω ειδικής πρόσδεσής της σε θέσεις

της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (ή ACCN₆GGT) ,που ονομάζονται περιοχές σύνδεσης της E2 (E2 binding sites, E2BSs), και είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή, ανάλογα με την φύση των σχετιζόμενων κυτταρικών παραγόντων [81,82]. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται εντός της περιοχής LCR του HPV-16 και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 [83,84]. Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο TATA Box ακριβώς ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής [85,86]. Οι άλλες δύο θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής [87].

Η πρωτεΐνη E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται στις θέσεις που είναι τοποθετημένες μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7. Όταν η συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 είναι κατειλημμένες οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωματική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 [88,89,90].

Η ρύθμιση της ιικής έκφρασης συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στη διαφοροποίηση υπάρχει μια αλλαγή στον όψιμο υποκινητή, ο οποίος δεν καταστέλλεται από την E2, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη έκφραση των E1 και E2 που οδηγεί στην ενίσχυση του ιικού DNA. Η E2 σχηματίζει, επίσης, σύμπλοκα με τους C/EBP μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλούς υποκινητές που παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη E2 στρατολογεί μία κυτταρική πρωτεΐνη, την Brd4, για την ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στα κυτταρικά χρωμοσώματα. Η ενσωμάτωση αυτή στον πυρήνα των

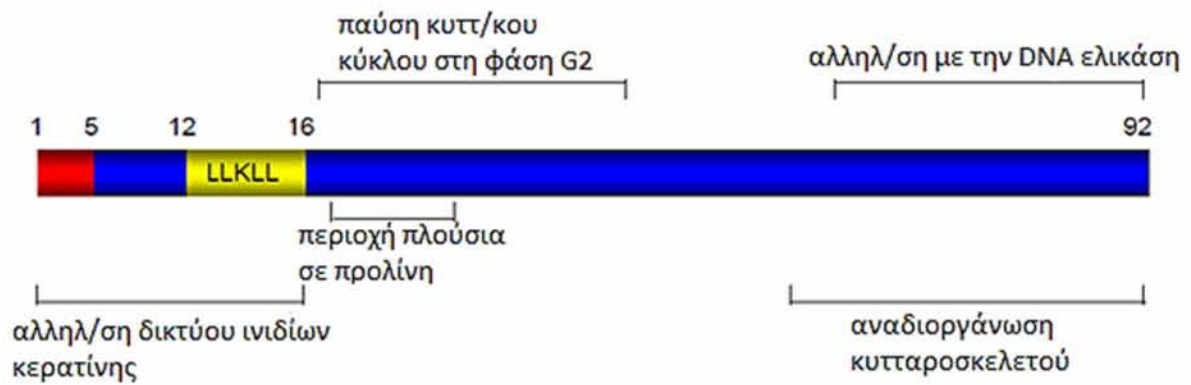
κυττάρων εξασφαλίζει την διανομή του ιικού γενώματος σε κάθε θυγατρικό κύτταρο μετά την διαίρεσή του.

Ένας ακόμη βασικός ρόλος της πρωτεΐνης E2 είναι η συμβολή της στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, ενισχύοντας την δράση της E1 πρωτεΐνης [91]. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την συμμετοχή της E2 στην κατανομή του επισωμικού γονιδιώματος του ιού στα θυγατρικά κύτταρα στην φάση της μίτωσης, καθώς και στη διαδικασία της συναρμολόγησης του ιικού γονιδιώματος στα ιοσωμάτια [92,93].

1.4.2.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) του γονιδίου E4 των Papilloma ιών εμπεριέχεται στο ORF του E2 και το μέγεθός του ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών τύπων PVs. Η πρωτεΐνη E4 μεταφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, του οποίου τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το γονίδιο E1. Η πρωτεΐνη που παράγεται συνήθως αναφέρεται ως E1⁺E4 και ανιχνεύεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPVs σε ποσότητες μεγαλύτερες από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού. Έτσι, παρόλο που η E4 θεωρείται πρόιμη πρωτεΐνη, εντοπίζεται αποκλειστικά στις διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλίου που έχουν μολυνθεί από τον ιό [94,95,96].

Όσον αφορά στον τύπο HPV-16, η πρωτεΐνη E4 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: α) Το N-τελικό άκρο, όπου συναντάται το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLKLL), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης. β) Μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. γ) Την C-τελική περιοχή, που είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης [97].



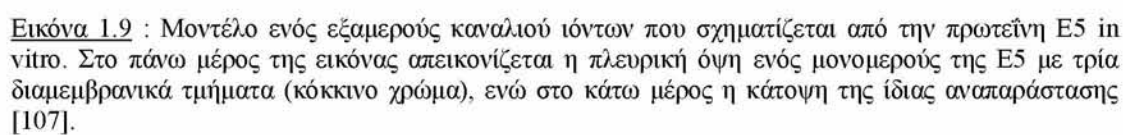
Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης E4 (E1^ΔE4).

Η βασική λειτουργία της ιικής πρωτεΐνης E4 είναι η συμβολή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Έχει επίσης προταθεί ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων, καθώς και στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. Εκτός των άλλων, η E1^ΔE4 πρωτεΐνη του HPV-16 έχει την δυνατότητα να επάγει την απόπτωση, καθώς έχει μελετηθεί η σύνδεση και αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια. Τέλος, ικά μεταλλάγματα ανάκανα να εκφράσουν την πρωτεΐνη E4 εμφανίζουν ιδιαίτερα μειωμένη αντιγραφική ικανότητα, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστός ο τρόπος και ο βαθμός συμμετοχής της πρωτεΐνης E4 κατά την αντιγραφή του ιικού γενόματος [98,99,100,101].

1.4.2.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη μήκους 83 αμινοξέων και εκφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, το οποίο ξεκινά τη μεταγραφή του ανοδικά του γονιδίου E2. Είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία συγκεντρώνονται σε μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, παρέχοντας τη δυνατότητα στην πρωτεΐνη E5 να αλληλεπιδρά με έναν σημαντικό αριθμό κυτταρικών [102].

Όταν βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης είναι παρούσα και στις μεμβράνες της συσκευής Golgi, στην πλασματική μεμβράνη και σπανιότερα στον πυρηνικό φάκελο [103,104].



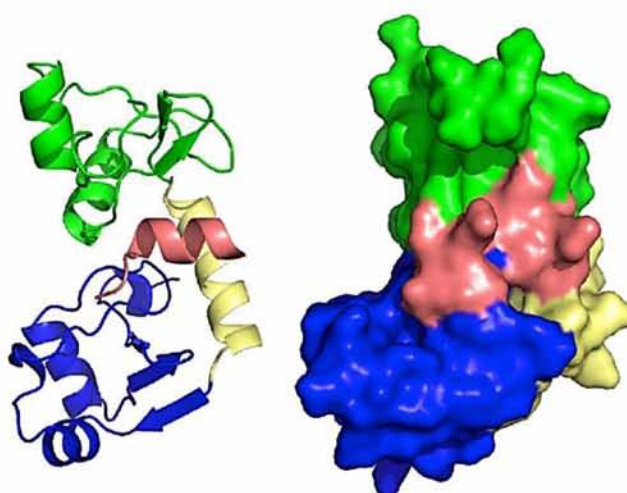
Σελίδα 28

οδηγώντας σε αλλαγές στην οξύνιση των ενδοσωμάτων και σε αποικοδόμηση του υποδοχέα του EGF [110]. Μια επιπλέον δράση της πρωτεΐνης E5 είναι η ικανότητά της να μειώνει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (cyclin-dependent protein kinase inhibitors, CKIs) p21 και p27, προκαλώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, και διεγείροντας έτσι τη μεταγραφή των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 [111]. Τέλος, η πρωτεΐνη E5 εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση, αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του ανθρώπινου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC τάξης I), εγκλωβίζοντάς τον στην συσκευή Golgi και εμποδίζοντας έτσι την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο οδηγεί στην μείωση του επιπέδου έκφρασης κυτταρικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση [112].

1.4.2.5. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη είναι μια πρόιμη ογκοπρωτεΐνη, η οποία τόσο στους ιούς υψηλής επικινδυνότητας όσο και σε εκείνους χαμηλής επικινδυνότητας αποτελείται από 151 αμινοξέα. Είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την διάρκεια της HPV λοίμωξης και εμπλέκεται σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου-ξενιστή [113]. Κύρια λειτουργία της αποτελεί η συμβολή της στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV ιό. Βέβαια, από μόνη της η E6 δεν είναι ικανή να μετασχηματίσει κερατινοκύτταρα. Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7 [114].

Όσον αφορά στη δομή της η E6 περιέχει στο N-τελικό (το οποίο διμερίζεται) και στο C-τελικό της άκρο από μία δομική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου η οποία φέρει δυο μοτίβα Cys-X-X-Cys. Οι δύο αυτές περιοχές είναι πολύ καλά συντηρημένες και με την βοήθεια μιας συνδετικής αλληλουχίας με δομή α-έλικας, που τις ενώνει, δημιουργούν μία κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το συντηρημένο πεπτίδιο LXXLL.

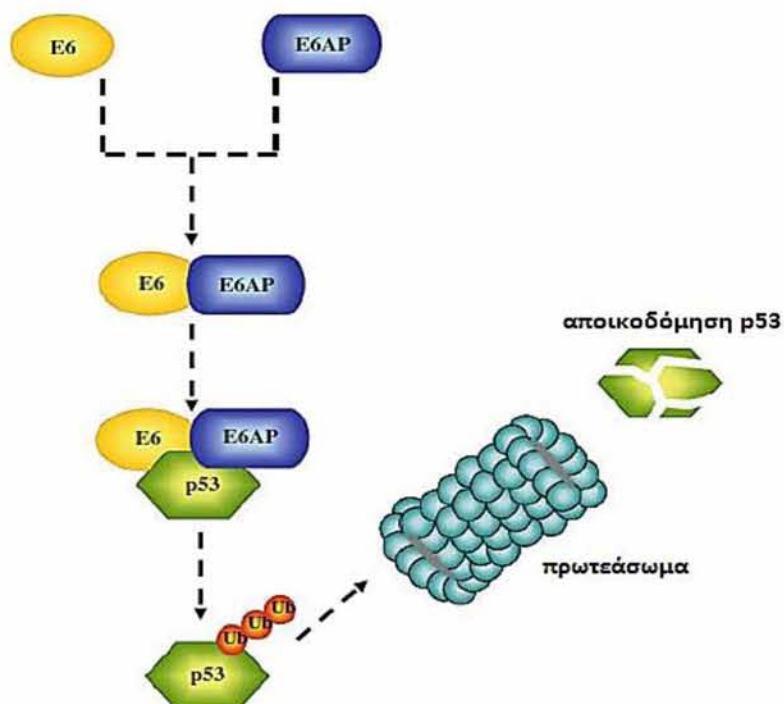


Εικόνα 1.10: Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο φαίνεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία με κίτρινο και η συντηρημένη αλληλουχία LXXLL με ροζ χρώμα [116].

Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες και δημιουργεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η αποφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης [115,116].

Η E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει την δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες. Βέβαια, έχει παρατηρηθεί ότι οι πρωτεΐνες E6 των στελεχών υψηλού κινδύνου βρίσκονται στον πυρήνα κυρίως και στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι πρωτεΐνες E6 των στελεχών χαμηλού κινδύνου βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, διότι στερούνται τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS).

Η πιο κατανοητή, αλλά και διεξοδικότερα μελετημένη λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η ικανότητά της να προκαλεί την αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η οποία όπως είναι γνωστό ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Φυσιολογικά, όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, όπως για παράδειγμα η δημιουργία βλάβης στο DNA ενεργοποιείται η p53 και επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Μέσω διαφόρων μελετών έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E6 προσδένεται στην ουβικιτινική λιγάση E6AP μέσω της συντηρημένης αλληλουχίας LXXLL. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο E6/E6AP προσδένεται στην p53, η οποία ουβικιτινιλιώνεται άμεσα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα 26S προκειμένου να αποικοδομηθεί. Συνεπώς η αποικοδόμηση της p53 επιτρέπει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M και οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [116,117,118]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η αποικοδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 των ιών HPV υψηλού κινδύνου. Αντίθετα, η E6 των χαμηλού κινδύνου HPVs παρόλο που μπορεί να προσδένεται στην E6AP δεν μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της p53.



Εικόνα 1.11: Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την ουβικιτινική λιγάση E6AP. Το διμερές σύμπλοκο, στη συνέχεια, στρατολογεί την p53 και την οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση [119].

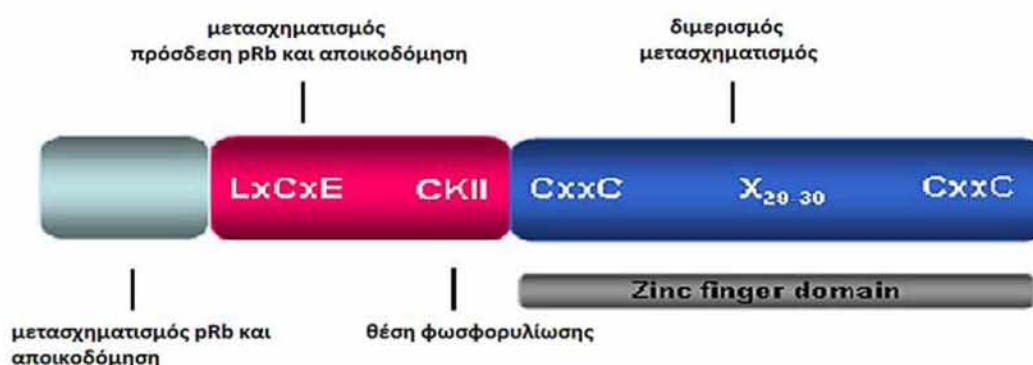
Η δεύτερη σημαντική λειτουργία της E6 αποτελεί η ικανότητά της να ενεργοποιεί την τελομεράση, ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο που διατηρεί τις τελομερικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Αναλυτικότερα, η ογκοπρωτεΐνη E6 μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης του παράγοντα NFX1-91, οποίος είναι αναστολέας της έκφρασης του γονιδίου hTERT, ενεργοποιεί το γονίδιο hTERT. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του μήκους των τελομερών και συνεπώς την αθανатоποίηση των κυττάρων. Η ογκοπρωτεΐνη E6 παρεμβαίνει, επίσης, στις διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης. Έχει βρεθεί ότι μερικοί HPVs προσδένονται στους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP και p300 και καταστέλλουν την μεταγραφική τους δραστηριότητα [120,121].

Πέραν των παραπάνω ιδιοτήτων της πρωτεΐνης E6, μια ακόμη λειτουργία της αποτελεί η αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής αποδομούνται μέσω σύνδεσης τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου. Έχει δείχθει μέσω *in vitro* πειραμάτων σε ποντίκια ότι η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών PDZ έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας. Επιπλέον, η E6 είναι ικανή να ασκήσει αντιαποπτωτική δράση μέσω της πρόσδεσης της σε πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (BAK, BAX) τις οποίες και οδηγεί σε ουβικιτινίωση και στη συνέχεια σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S [122,123].

1.4.2.6. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η E7 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από 100 αμινοξικά κατάλοιπα. Πρόκειται για την δεύτερη ογκοπρωτεΐνη του ιού, η οποία σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E6 επάγει την έναρξη της ογκογένεσης και προκαλεί γενωμική αστάθεια. Βασικός ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αποτελεί η συμβολή της στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων και στον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από HPV ιό υψηλού κινδύνου [124].

Δομικά διακρίνεται σε τρεις συντηρημένες περιοχές (conserved regions, CR) CR1, CR2 και CR3. Το αμινοτελικό άκρο της περιλαμβάνει την περιοχή CR1, η οποία περιέχει τα κατάλοιπα 1-20 και είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb. Το καρβοξυτελικό της άκρο φέρει την περιοχή CR3, που αποτελείται από τα αμινοξέα 40-100, περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Ανάμεσα στις δύο αυτές περιοχές βρίσκεται η περιοχή CR2, η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα 21-39 και είναι αρκετά συντηρημένη σε όλους τους τύπους υψηλού κινδύνου. Η περιοχή CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, που εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb. [125].



Εικόνα 1.12: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης E7, όπου επισημαίνονται οι κύριες λειτουργικές περιοχές της. Διακρίνεται σε τρεις περιοχές: α) η CR1 (γκρίζο ανοιχτό χρώμα) που περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, β) η CR2 (κόκκινο χρώμα) που περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία LXCXE και γ) η CR3 (μπλε χρώμα) που περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου [125].

Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης E7 είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107). Στα φυσιολογικά κύτταρα, απουσία μιτογόνου σήματος, η pRb βρίσκεται στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή και δημιουργεί σύμπλοκο με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή E2F, με στόχο την αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς και στην κυτταρική απόπτωση. Μετά το περιοριστικό σημείο, κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S η pRb φωσφορυλιώνεται από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D, αποδεσμεύεται από τον E2F και ο E2F ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA [126].

Στην περίπτωση των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από κάποιον τύπο HPV ιού, η πρόσδεση της πρωτεΐνης E7 του ιού στην αποφωσφορυλιωμένη pRb δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στον μεταγραφικό παράγοντα E2F, διότι επάγει την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος. Συνεπώς η πρωτεΐνη E7 επιτρέπει στα κύτταρα να περάσουν στην φάση S. Εκτός από την pRb, η ογκοπρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F. Συνέπεια των ανωτέρω δράσεων της E7 αποτελεί η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι παρόλο που οι πρωτεΐνες E7 όλων των στελεχών μπορούν να προσδένονται στα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος, οι E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου προσδένονται με πολύ υψηλότερη συγγένεια στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τις E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου [127].

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά με τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases inhibitors, CKIs) p21 και p27. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η μετάβαση από την G1 στην φάση S ελέγχεται από τα σύμπλοκα κυκλινών- κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζονται από τους CKIs. Η E7 αναστέλλει τη δράση των p21 και p27 των οποίων κύριος στόχος είναι η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση cdk2 που αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S. Επομένως η E7 διατηρεί σε υψηλά επίπεδα την cdk2 ενώ παρατηρούνται και υψηλά επίπεδα των κυκλινών A και E. Με αυτόν τον τρόπο επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου [128].

Εκτός των παραπάνω λειτουργιών της, η E7 έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά και με μια τρίτη ομάδα πρωτεϊνών, τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs), οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή των γονιδίων. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και βασική τους λειτουργία είναι να αφαιρούν ακετυλο-ομάδες από τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών H3 και H4 και να ευνοούν μια πιο κλειστή χρωματινική δομή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η pRb δημιουργεί σύμπλοκο με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές των E2F γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό, καταστέλλεται η μεταγραφή του παράγοντα E2F και αναστέλλεται η λειτουργία του, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Μετά από μόλυνση με τον HPV ιό, η E7 μέσω της CR3 περιοχής της συνδέεται στις HDACs, παρεμποδίζοντας την σύνδεσή τους με την pRb, με αποτέλεσμα να μεταγράφεται ο E2F και να διεγείρει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, απουσία μιτογόνου σήματος [129].

Γονίδιο	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση αντιγραφής. Υπάρχει σε δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός καταστολέας. Δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή του ιικού γενώματος.
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών όπως η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHRT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
L1	Πλεονάζουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Ελάσσων καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

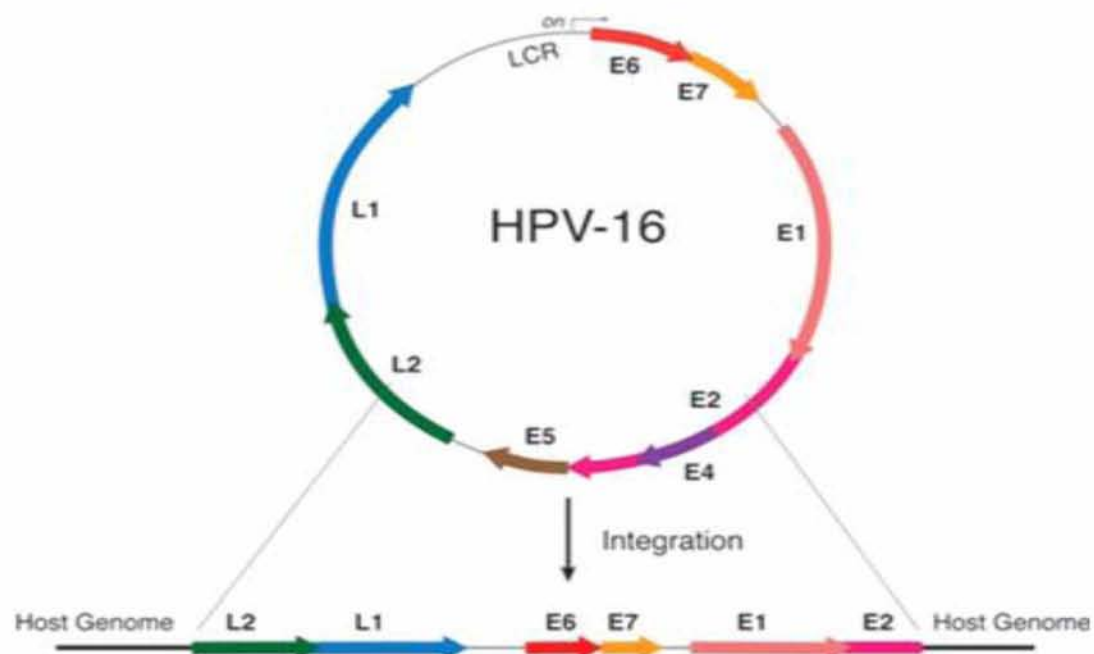
Πίνακας 1.3: Περιληπτική αναφορά των λειτουργιών όλων των πρωτεϊνών του ιού.

1.5 Η μορφή του γονιδιώματος των HPV

Το γονιδίωμα του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου-ξενιστή, ενώ δεν αποκλείεται να εντοπίζεται ταυτόχρονα και στις δύο μορφές του. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο 90% των μολύνσεων από υψηλού κινδύνου HPV ιό, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Ωστόσο, στο υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε χρωμοσωμική αστάθεια [130].

Ο ιός υπό φυσιολογικές συνθήκες, αφού εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή, μεταφέρει το γονιδίωμα του στον πυρήνα, όπου αυτό διατηρείται στην κυκλική του μορφή ως επίσωμα [8]. Επίμονη λοίμωξη από HPV υψηλού κινδύνου μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση του ιικού επισώματος στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Κατά την ενσωμάτωση συνήθως πραγματοποιείται ρήξη των γονιδίων E1 ή και E2, με αποτέλεσμα το κυκλικό γονιδίωμα του ιού να μετατρέπεται σε γραμμικό DNA. Σπανιότερα η ρήξη μπορεί να συμβεί στα γονίδια L1 και L2. Τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα [131]. Αντίθετα, σημαντικό μέρος του γονιδίου E2 χάνεται κατά την ενσωμάτωση. Το προϊόν του τμήματος του E2 γονιδίου που χάνεται λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων. Συνεπώς προκαλείται υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, η οποία συμβάλλει καθοριστικά στη συσσώρευση γενετικών λαθών και οδηγεί στην ανάπτυξη κακοήθειας. Επομένως, ο έλεγχος της μορφής του γονιδιώματος του HPV αποτελεί έναν χρήσιμο βιο-δείκτη για την πρόβλεψη της εξέλιξης της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και την πιθανή ανάπτυξη καρκίνου[132].

Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV στο DNA του κυττάρου-ξενιστή αποτελεί ένα καθοριστικό βήμα για την τραχηλική καρκινογένεση και η εμφάνισή της σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από CIN II/III σε διηθητικό καρκίνο [133,134]. Παρόλα αυτά, η ενσωμάτωση δεν αποτελεί απαραίτητο βήμα για την δημιουργία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκληθεί και από κύτταρα που περιέχουν τον ιό μόνο υπό την επισωματική του μορφή. Όσον αφορά στον HPV-16, περίπου το 30% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φέρουν τον ιό υπό την επισωματική του μορφή, ενώ στο υπόλοιπο 70% των περιπτώσεων ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο DNA του κυττάρου-ξενιστή [24,133,135].



Εικόνα 1.13: Στο επάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται η επισωματική μορφή του γονιδιώματος του ιού HPV-16 και στο κάτω μέρος απεικονίζεται η γραμμική μορφή του ενσωματωμένου ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

1.6. Θέσεις ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή

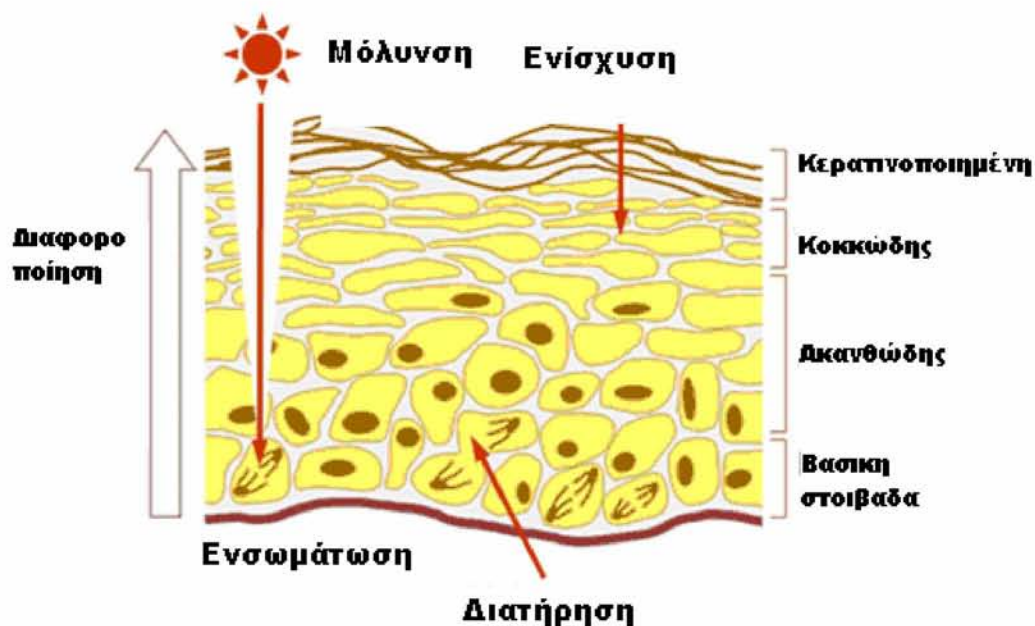
Εκτός από τη μορφή του γονιδιώματος και τις θέσεις ρήξης του ιού, εξίσου σημαντική είναι και η γνώση των θέσεων ενσωμάτωσης στο χρωμοσωμικό DNA. Έως σήμερα έχουν προσδιοριστεί πάνω από 250 θέσεις ενσωμάτωσης του HPV. Ο μηχανισμός της ενσωμάτωσης περιλαμβάνει το σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA του ιού και του χρωμοσώματος και την συνένωσή τους μέσω κυτταρικών πρωτεϊνών. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως [136].

Παρόλο που θεωρητικά ο HPV ενσωματώνεται σε διάφορες θέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα, έχει παρατηρηθεί ότι προτιμά μεταγραφικά ενεργές περιοχές και κοινές εύθραυστες θέσεις. Επίσης, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ενσωμάτωση του ιού δεν πραγματοποιείται εντελώς τυχαία και ότι οι θέσεις ενσωμάτωσης τείνουν να εντοπίζονται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές του κυτταρικού γονιδιώματος και δίπλα σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο. Συνεπώς, με την ενσωμάτωση του ιικού DNA ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να απενεργοποιούνται, ενώ κάποια ογκογονίδια να ενεργοποιούνται προωθώντας την δημιουργία κακοήθειας [137].

1.7. Ο κύκλος ζωής των HPV ιών

1.7.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή

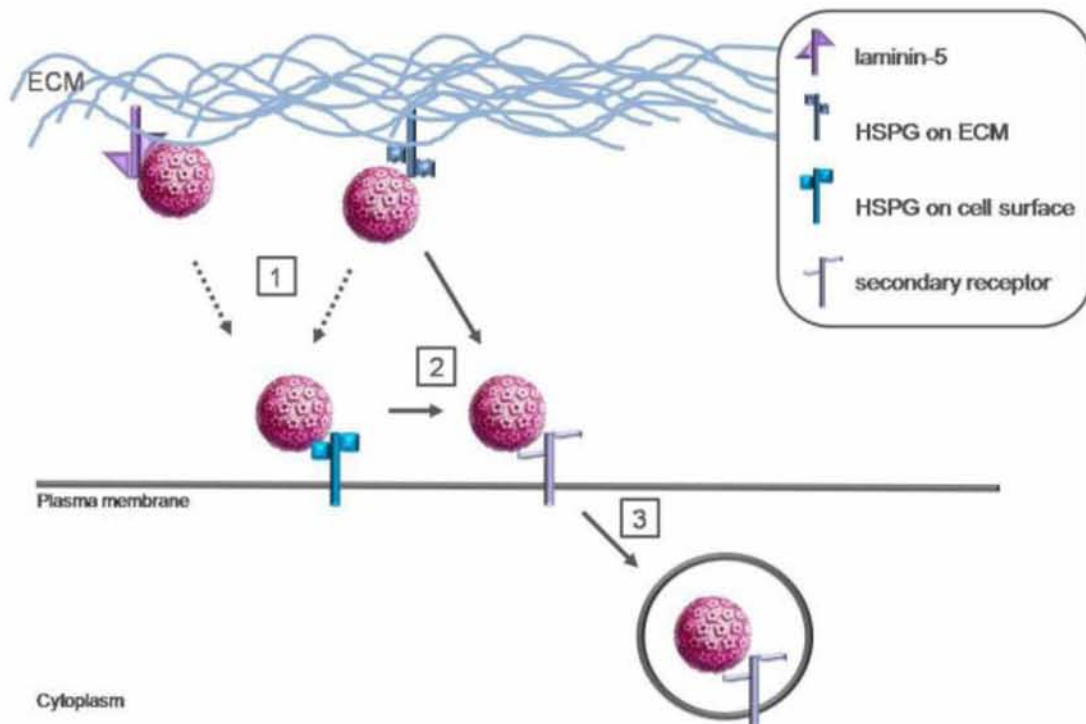
Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν το πολύστιβο επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου. Η μόλυνση ξεκινά μόλις τα ιικά σωματίδια προσβάλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροεκδορών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Ο κύκλος ζωής των ιών ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Τα συγκεκριμένα κύτταρα διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος οδηγούνται σε απόπτωση. Έπειτα από την είσοδο του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας αυτός, συνεχίζοντας τον κύκλο ζωής του, εκφράζει διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού συμβαίνει στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται [138].



Εικόνα 1.14: Είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, μετά από μικροτραυματισμό του επιθηλίου.

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο απαιτεί την δέσμευσή του με κυτταρικούς υποδοχείς. Μάλιστα οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν πως ο υποδοχέας πρόσδεσης του ιού είναι η θεική ηπαρίνη (Heparin Sulfate Proteoglycan HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη.

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δομικές αλλαγές στο καψίδιο, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του ιού σε έναν δευτερεύοντα υποδοχέα των κερατινοκυττάρων, όπως οι α6-ιντεγκρίνες, που είναι απαραίτητος για την διείσδυση του ιού και τη μεταφορά του γονιδιώματός του στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του ιοσωματίου στον κυτταρικό υποδοχέα οι μορφολογικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο καψίδιο του, φέρνουν στην επιφάνεια ένα μέρος της πρωτεΐνης L2. Μόλις συμβεί αυτό, ένα τμήμα του N-τελικού άκρου της L2 καψιδιακής πρωτεΐνης κόβεται από φουρίνη, γεγονός που επάγει τη σύνδεση του καψιδίου στον δεύτερο υποδοχέα. Έπειτα, τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Στους περισσότερους HPV ιούς, όπως και στον HPV-16, η ενδοκύτωση πραγματοποιείται με κυστίδια κλαθρίνης. Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το καψίδιο αποσυναρμολογείται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και απελευθερώνεται ένα σύμπλοκο καψιδιακής πρωτεΐνης L2 και ιικού DNA. Το σύμπλοκο L2- DNA μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου όπου ελέγχει τη σωστή είσοδο του DNA σε αυτόν, η οποία κατά πάσα πιθανότητα συμβαίνει κατά τη μίτωση των κυττάρων [139,140,141]. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμινίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων.

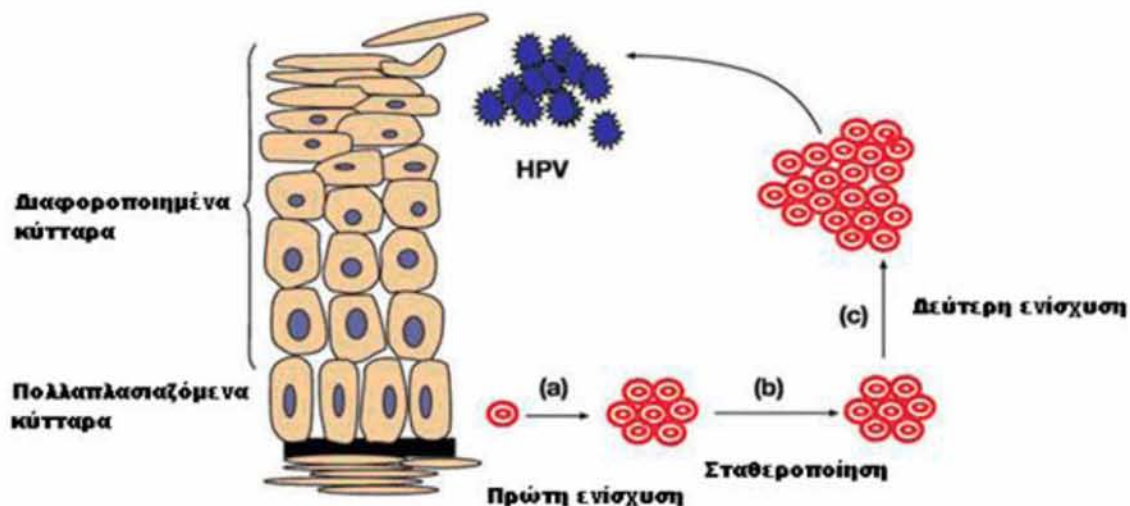


Εικόνα 1.15: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των HPV ιών με τους υποδοχείς του εξωκυττάρου χώρου και της πλασματικής μεμβράνης προκειμένου να εισαχθεί στο κύτταρο [142].

1.7.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Οι papilloma ιοί αντιγράφουν το γονιδιωμα τους σε διαφορετικές περιόδους κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους και με διαφορετική συχνότητα. Συγκεκριμένα, κατά τον παραγωγικό κύκλο ζωής τους η διαδικασία της αντιγραφής τους μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές φάσεις, οι οποίες αντιστοιχούν στη διαδικασία εγκατάστασης του ιού, διατήρησής του και δημιουργίας απογόνων ικανών για περαιτέρω μόλυνση [92].

Αρχικά, μόλις τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολυνθούν από τον ιό παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γενώματος σε 200 περίπου αντίγραφα σε κάθε κύτταρο. Σε αυτή τη φάση το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα με τη μορφή επισώματος. Για το στάδιο αυτό της αντιγραφής είναι απαραίτητες δύο πρώιμες πρωτεΐνες του HPV, η E1 που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη αντιγραφής των HPV ιών και η E2. Πιο αναλυτικά, ένα διμερές της E1 προσδένεται σε συνεργασία με ένα διμερές της E2 στο ιικό DNA στη θέση έναρξης της αντιγραφής (ori). Στη συνέχεια η E2 αποδεσμεύεται και η E1 ξετυλίγει το DNA επιτρέποντας στις πρωτεΐνες αντιγραφής του κυττάρου να εκτελέσουν το έργο τους. Επιπλέον η E1 και η E2 πιθανόν κατέχουν κάποιο ρόλο και στην διατήρηση του ιικού γονιδιώματος στην επισωματική μορφή, εφόσον ο αριθμός των αντιγράφων σταθεροποιηθεί. Η δεύτερη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος πραγματοποιείται κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στην φάση αυτή το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Μέσω της διαδικασίας αυτής ο ιός σταθεροποιείται στο επιθήλιο. Η τρίτη και τελευταία φάση αντιγραφής στον κύκλο ζωής των papilloma ιών πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια [143,144].



Εικόνα 1.16: α) Αρχικά, αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας πραγματοποιείται μια πρώτη ενίσχυση του ιικού γενώματος, με την 200 περίπου αντιγράφων του σε κάθε κύτταρο. β) Στην συνέχεια ακολουθεί η σταθεροποίηση του ιικού γενώματος και η αντιγραφή του γίνεται παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S. γ) Τέλος στα μολυσμένα κύτταρα των ανωτερων στοιβάδων παρατηρείται μια παρατεταμένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού με στόχο την παραγωγή πολυάριθμων μορίων ιικού DNA για την σύνθεση νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων.

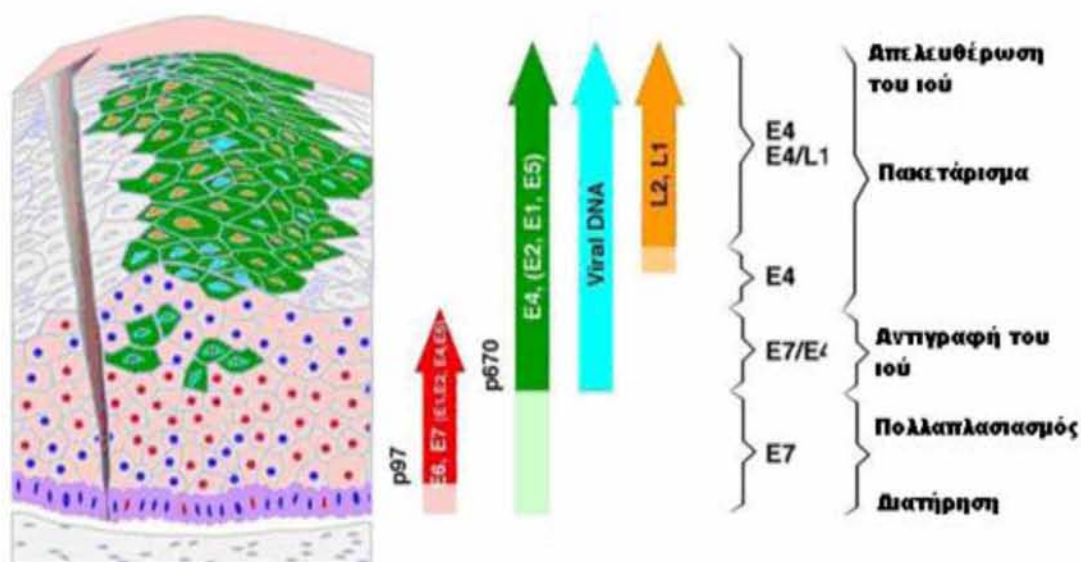
1.7.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύκλος ζωής των HPVs είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η έκφραση των γονιδίων των papilloma ιών ρυθμίζεται από δύο υποκινητές, τον πρώιμο και τον όψιμο υποκινητή. Όσον αφορά στον τύπο HPV-16 ο πρώιμος υποκινητής είναι ο p97 και ο όψιμος ο p670. Η μεταγραφική τους δραστηριότητα υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από την ρυθμιστική περιοχή LCR, διότι σε αυτήν εντοπίζεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, στην περιοχή LCR προσδένεται και ο ιικός ενεργοποιητής/καταστολέας E2.

Ο πρώιμος υποκινητής p97 βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των έξι πρώιμων γονιδίων του ιού (E1, E2, E4, E5, E6, E7) στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος (E1, E2) καθώς και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7).

Ο όψιμος υποκινητής p670, είναι τοποθετημένος εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7, ενεργοποιείται ειδικά στις διαφοροποιημένες στιβάδες

του επιθηλίου και συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων E1 και E2, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων, ενισχύοντας έτσι το γονιδίωμα του ιού. Επιπλέον, ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων του ιού L1 και L2, η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των ιοσωματίων [24,46].



Εικόνα 1.17: Οργάνωση του κύκλου ζωής κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από HPV16. Αριστερά φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση του δέρματος όπου φαίνεται το μοτίβο γονιδιακής έκφρασης του HPV καθώς το μολυσμένο κύτταρο μεταναστεύει προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Αμέσως μετά τη μόλυνση της βασικής μεμβράνης ο υποκινητής p97 κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7, που είναι απαραίτητα για την είσοδο του κυττάρου στη φάση S (κόκκινο). Σε ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες ρυθμίζεται θετικά ο υποκινητής p670 και οι ιικές πρωτεΐνες αντιγραφής (E1, E2, E4, E5) εκφράζονται σε αφθονία (πράσινο), διευκολύνοντας την ενίσχυση των ιικών γονιδιωμάτων (μπλε). Στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου όπου πλέον παράγονται οι ιικές καψιδιακές πρωτεΐνες (πορτοκαλί) [138].

1.7.4. Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των HPV ιών περιλαμβάνει την τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων, την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων και την απελευθέρωση των τελευταίων από το κύτταρο ξενιστή. Η σύνθεση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα. Εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 απαιτείται την παρουσία της πρωτεΐνης E2, η οποία όπως έχει παρατηρηθεί συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων. Αρχικά παράγεται η πρωτεΐνη L2, η οποία μετά την έκφρασή της εντοπίζεται στον πυρήνα. Η L2 επάγει το πακετάρισμα του ιικού

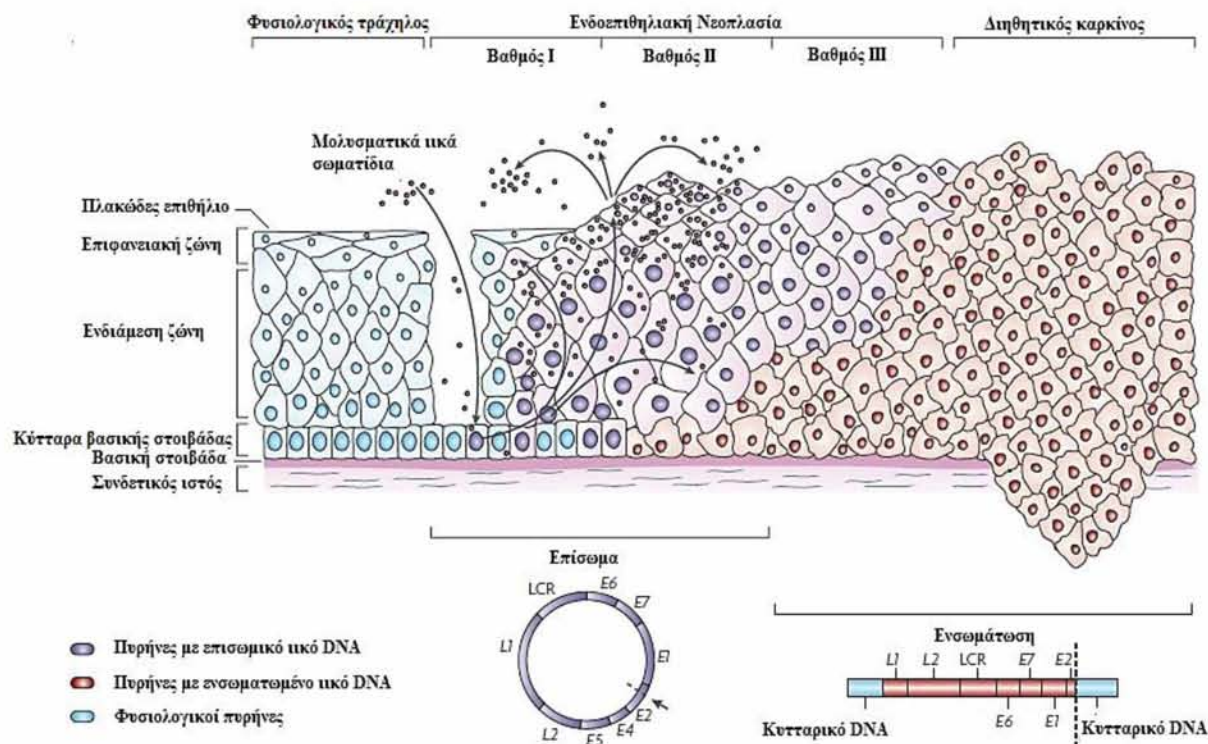
γενώματος εντός του καψιδίου και σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA του ιού. Από την άλλη πλευρά η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, τα οποία αποτελούν τη βασική δομική μονάδα του καψιδίου των papilloma ιών [28,39,145]

Η ωρίμανση του ιού συμβαίνει στα κερατινοκύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας. Τελικά, ο ιός απελευθερώνεται από τα κύτταρα χωρίς να προκαλέσει τη λύση τους, με τη βοήθεια της E1^ΛE4 πρωτεΐνης, η οποία είναι ικανή να διαρρήξει το δίκτυο κερατίνης που έχει σχηματιστεί στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων [97,146].

1.8. Ιστολογικές αλλοιώσεις

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) η περιγραφή της δυσπλασίας αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ήπια, μέτρια, σοβαρή δυσπλασία ή καρκίνωμα *in situ*, με βάση το πάχος του τραχηλικού επιθηλίου που καταλαμβάνεται από νεοπλασματικά κύτταρα [147]. Ο όρος τραχηλική ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) αναπτύχθηκε αργότερα προκειμένου να δοθεί έμφαση στο φάσμα των αλλοιώσεων που προκαλούν οι HPVs. Έτσι, η ήπια δυσπλασία χαρακτηρίζεται ως CIN I, η μέτρια δυσπλασία ως CIN II και η σοβαρή δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ* ως CIN III [148]. Ωστόσο, η πιο πρόσφατη ταξινόμηση είναι αυτή της Bethesda, η οποία μετά από την εξέταση Pap κατατάσσει τις τραχηλικές αλλοιώσεις σε δύο ομάδες: χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) [149].

Βέβαια στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή αυτή καθαυτή δεν αρκεί για την κακοήγη εξαλλαγή. Μάλιστα, η τελευταία αποτελεί ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως γενετικές μεταλλάξεις, ογκοπρωτεΐνες και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Συνεπώς, η λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο [150].



Εικόνα 1.19. Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV [151].

1.9 Κλινικά συμπτώματα

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων παρουσιάζουν τροπισμό που εξαρτάται από τον τύπο τους για τα επιθήλια του δέρματος και του βλεννογόνου. Όπως και πολλά από τα υπόλοιπα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, οι HPV ιοί συνήθως προκαλούν σε αρχικό στάδιο ασυμπτωτική μόλυνση του ασθενή. Συνεπώς, η λοίμωξη δεν διαπιστώνεται έγκαιρα και κατ' επέκταση δεν αντιμετωπίζεται, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να μεταδίδεται στον πληθυσμό. Παρόλα αυτά αλλοιώσεις μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μεταξύ τριών εβδομάδων και οχτώ μηνών μετά την μόλυνση με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των συμπτωμάτων στους τρεις μήνες.

Οι HPVs προκαλούν ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο, μέχρι νεοπλασίες καλοήθους και κακοήθους φύσεως του τραχήλου της μήτρας. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου προκαλούν λοιμώξεις χαμηλού κινδύνου στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήγη θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλειφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου,

σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι όπως προαναφέρθηκε ο HPV-16 , αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Οι υψηλής επικινδυνότητας HPV ιοί που συναντώνται στον γενικό πληθυσμό συνήθως προκαλούν στοματοφαρυγγικές αλλοιώσεις ή τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Βέβαια, πέρα από τους τύπους των HPV που προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι τύποι των papilloma ιών που σχετίζονται με την εμφάνιση μιας σειράς δερματικών παθήσεων που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος [24,152].

Συμπτώματα	Στέλεχος
Θηλώματα του πέλματος (μυρμηγκιές)	HPV-1, 2, 4, 63
Επίπεδα θηλώματα	HPV-3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
Μωσαικά θηλώματα	HPV-2, 27, 57
<i>Epidermodisplasia Verruciformis</i>	HPV-2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
Επιδερμικές αλλοιώσεις (Μη θηλωματικές)	HPV-37, 38
Αναπνευστική παπιλλομάτωση	HPV- 6, 11
Καρκίνος των πνευμόνων	HPV- 6, 11, 16, 18
Κονδυλώματα στον λάρυγγα	HPV-6, 11, 30
Καρκίνος στον λάρυγγα	HPV-16, 18
Κονδυλώματα στην κοιλότητα της γνάθου	HPV-16, 18
Στοματική επιθηλιακή υπερπλασία	HPV-13, 32
Καρκίνος στο στόμα	HPV-16, 18
Στοματική λευκοπλακία	HPV-16, 18
Καρκίνος στον οισοφάγο	HPV-16, 18
Γιγάντια κονδυλώματα (<i>Buschke-Lowenstein tumor</i>)	HPV-6, 11
Κοινά θηλώματα	HPV-1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65

Πίνακας 1.4: Συμπτώματα από μόλυνση με τα διάφορα είδη HPV.

Όσον αφορά στον τρόπο μετάδοσής τους, αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως μέσω της σεξουαλικής επαφής αλλά και με πολύ χαμηλότερη συχνότητα, χωρίς σεξουαλική επαφή μέσω επαφής με ουρογενετικά εκκρίματα. Ακόμη, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί από τη μητέρα στο νεογέννητο [153].

1.10. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου από γυναικολογικό καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα, και είναι ο 5ος πιο θανατηφόρος καρκίνος των γυναικών.

Κάθε χρόνο εκδηλώνονται 400.000 περίπου νέες περιπτώσεις γυναικών που πάσχουν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ ο τελευταίος αποτελεί δεύτερη σε συχνότητα ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του μαστού. Στις ΗΠΑ ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στον τράχηλο έχει αυξηθεί κατά 80% τα τελευταία 50 χρόνια [154]. Ωστόσο, πάνω από το 85% των ετήσιων θανάτων που προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας εντοπίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες -Ν.Α Ασία, Ν. Αμερική, υποσαχάρια Αφρική-, όπου η ακριβής επίπτωση και θνησιμότητα δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί με ακρίβεια. Στις χώρες αυτές, η νόσος εμφανίζεται συνήθως σε προχωρημένα στάδια, λόγω απουσίας του προληπτικού ελέγχου, όπου σε συνδυασμό με την έλλειψη ικανοποιητικών μέσων για την αντιμετώπισή της οδηγεί στην αύξηση των θανάτων που οφείλονται σε αυτήν.

1.11 Εμβόλια έναντι του HPV ιού

Η παρασκευή των HPV εμβολίων βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο η έκθεση στον ιό όσο και η εξάλειψη της HPV λοίμωξης σχετίζονται με χαμηλό μετέπειτα κίνδυνο επαναμόλυνσης. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα έχουν αποδείξει ότι ο εμβολιασμός με κενά μη μολυσματικά ιοσωμάτια που αποτελούνται μόνο από την L1 καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού [Virus-Like Particles (VLPs)] επάγει την παραγωγή αντισωμάτων και την ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης.

Για την παραγωγή του εμβολίου το γονίδιο L1 από το ιικό γονιδίωμα εισάγεται εντός φορέων έκφρασης, όπως ο ζυμομύκητας (για το τετραδύναμο εμβόλιο) ή ο βακίλλος (για το διδύναμο εμβόλιο). Με αυτόν τον τρόπο, οι L1 πρωτεΐνες αυτό-συναρμολογούνται σε VLPs. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι τα VLPs αποτελούνται μόνο από το καψίδιο του ιού, δεν περιέχουν ιικό DNA, δεν αποτελούν ζώντες εξασθενημένους ιούς και συνεπώς δεν μπορούν να προκαλέσουν ενεργό λοίμωξη.

Υπάρχουν δύο είδη εμβολίων που προστατεύουν από συγκεκριμένους τύπους HPV και έχουν πάρει έγκριση από τον Οργανισμό Υγείας και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), το διδύναμο Cervarix και το τετραδύναμο Gardasil. Το διδύναμο εμβόλιο προστατεύει από τους ογκογόνους τύπους HPV-16 και HPV-18. Στην Ελλάδα το εμβόλιο αυτό έλαβε άδεια κυκλοφορίας από τον ΕΟΦ το Δεκέμβριο του 2007 και έχει εγκριθεί για παιδιά και ενήλικες ηλικίας 9 έως 25 ετών. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου είναι υψηλή όσον αφορά στην πρόληψη των υψηλού βαθμού προκαρκινικών αλλοιώσεων CIN2/3 που σχετίζονται με τους συγκεκριμένους τύπους HPV. Το τετραδύναμο εμβόλιο προστατεύει από τους τύπους HPV-16 και HPV-18, αλλά και από τους τύπους HPV-6 και HPV-11 που ευθύνονται για τους ακροχορδόνες των γεννητικών οργάνων (οξυτενή κονδυλώματα). Στην Ελλάδα το τετραδύναμο εμβόλιο έλαβε άδεια κυκλοφορίας τον Ιανουάριο του 2007 και έχει εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων για κορίτσια και αγόρια ηλικίας 9-15 ετών και νέες γυναίκες ηλικίας 15-26 ετών [155,156].

1.12. Εργαστηριακή διάγνωση

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες, γεγονός που δυσχεραίνει την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωσή τους. Επιπλέον, οι ορολογικές μέθοδοι έχουν περιορισμένη ακρίβεια λόγω του γεγονότος ότι η μόλυνση με HPV ακολουθείται από μια χυμική ανοσολογική απάντηση ενάντια στη μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη, με τα αντισώματα να παραμένουν ανιχνεύσιμα για πολλά χρόνια. Συνεπώς, δεν καθίσταται δυνατή η ορολογική διάκριση μεταξύ της παρούσας και παλαιότερων μολύνσεων. Οπότε, η ακριβής διάγνωση για μόλυνση με τον HPV ιό στηρίζεται στην ανίχνευση του ιικού νουκλεϊκού οξέος. Ωστόσο, η πρώτη εξέταση γίνεται κυτταρολογικά με μικροσκοπική ανίχνευση των ανώμαλων επιθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, για την εξέταση μόλυνσης του τραχήλου ακολουθείται ακόμα και σήμερα το τεστ Παπανικολάου (Pap test). Εκτός αυτού, όμως, στα νοσοκομεία εφαρμόζεται ακόμη μια μέθοδος ρουτίνας, η οποία ακολουθεί το pap test, το Hybrid Capture- II.

1.12.1. Pap test

Το τεστ Παπανικολάου (Pap test) αποτελεί μια κυτταρολογική εξέταση, η οποία βασίζεται στην μικροσκοπική ανίχνευση μετασχηματισμένων τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων. Μετά τη συλλογή του το δείγμα είτε απλώνεται απευθείας σε αντικειμενοφόρο πλάκα είτε τοποθετείται σε διάλυμα συντήρησης. Σύμφωνα με την Food and Drug Administration (FDA) υπάρχουν δύο μέθοδοι για την παρασκευή υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτοί είναι το σύστημα PrepStain και η μέθοδος ThinPrep smear. Ωστόσο, η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία των κυτταρολόγων και τον ποιοτικό έλεγχο που εφαρμόζεται σε κάθε εργαστήριο.

1.12.2. Hybrid Capture- II

Το Hybrid Capture II test είναι μια μη ραδιενεργή μέθοδος, η οποία βασίζεται στην ενίσχυση σήματος που προκύπτει από τον υβριδισμό σημασμένων DNA ανιχνευτών με το DNA του HPV στόχου. Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται DNA ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες 13 τύπων HPV υψηλής επικυνδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπων HPV χαμηλής επικυνδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44) [157]. Στις ΗΠΑ η FDA συνιστά στις γυναίκες άνω των 30 ετών μαζί με το pap test και την χρήση του Hybrid Capture II test για την ανίχνευση του HPV ιού.

Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των διαφόρων τύπων HPV με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση HPV λοίμωξης από ότι, το pap test και το Hybrid Capture- II test.

1.13. Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

1.13.1. PCR σε συνδυασμό με Microarrays

Ένας ακόμη τρόπος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV ιών με μεγάλη ακρίβεια είναι αυτός του συνδυασμού της απλής PCR με τη μέθοδο των Microarrays. Τα microarrays αποτελούν μια τεχνική που χρησιμοποιεί τον υβριδισμό των σημασμένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια πλάκα η οποία διαβάζεται από ένα scanner. Η μέθοδος που χρησιμοποιεί τόσο την PCR όσο και τα microarrays ονομάζεται PCR/APEX. Η PCR/APEX χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV ιών υψηλού κινδύνου μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου E7 του ιού. Το γονίδιο E7 είναι αρκετά συντηρημένο σε κάποια σημεία του αλλά και αρκετά ποικιλόμορφο σε κάποια άλλα ώστε να επιτρέπει την ταυτοποίηση των διαφορετικών τύπων HPV. Στην μέθοδο της PCR/APEX αρχικά πραγματοποιείται μια multiplex PCR με διαφορετικούς primers για κάθε τύπο HPV. Έπειτα, τα προϊόντα μετά από ειδική επεξεργασία τοποθετούνται σε microarray chip με αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα τμήμα του γονιδίου E7 για να λάβει χώρα ο υβριδισμός. Μετά τον υβριδισμό το chip ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τυχόν μη υβριδοποιημένα νουκλεοτίδια και σαρώνεται για να εντοπιστούν οι θέσεις υβριδισμού, οι οποίες φθορίζουν δίνοντας έτσι σήμα που επεξεργάζεται από κατάλληλο λογισμικό. Το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να αναδειχθούν οι συμπληρωματικές αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τον τύπο του HPV [158].

1.13.2 Real time PCR

Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους PCR, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων, χρησιμοποιείται επίσης η Real time PCR. Με την συγκεκριμένη μέθοδο καθίσταται δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και οι τύπο-ειδικοί εκκινητές της μεθόδου είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6-E7 των HPV ιών υψηλής επικυνδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους ογκογόνους τύπους των

HPV και παραμένουν άθικτα τόσο στην επισωματική όσο και στη ενσωματωμένη μορφή του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Εκτός από την υψηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

1.13.3 Nested Multiplex PCR

Μια εξίσου σημαντική τεχνική για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV ιών αποτελεί η Nested Multiplex PCR. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητές, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου. Κατά τη διαδικασία αυτή δημιουργείται αρχικά ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων των γονιδίων E6 και E7, ώστε να υπάρχει αρκετό διαθέσιμο υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με Nested Multiplex PCR. Στην συνέχεια, στη Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται τύπο-ειδικοί εκκινητές, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η ακριβής ταυτοποίηση του ιού. Οι τύπο-ειδικοί εκκινητές συνήθως χρησιμοποιούνται σε μείγματα (cocktails). Εντός των μειγμάτων οι τύπο-ειδικοί εκκινητές οργανώνονται μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους, ενώ τα προϊόντα τους (PCR amplicons) θα πρέπει να έχουν διαφορετικά μήκη για να μπορούν να διακριθούν οι διαφορετικοί τύποι HPV κατά την ηλεκτροφόρηση [159].

1.14. Σκοπός

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μιας ταχύτατης ισοθερμικής μεθόδου Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) για την ανίχνευση των ιών HPV-16, η οποία να διακρίνεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση.

Κεφάλαιο 2^ο

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Κλινικά δείγματα

Για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας, προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας», το εργαστήριο Κυτταροπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ» και από ιδιωτικό ιστοπαθολογικό εργαστήριο.

Συνολικά εξετάστηκαν 57 δείγματα. Από την κυτταροπαθολογική ανάλυση προέκυψε πως από αυτά τα 13 ήταν αρνητικά για HPV-16 (WNL) (Πίνακας 2.1), τα 17 διαγνώστηκαν ως χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) (Πίνακας 2.2), τα 22 ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) (Πίνακας 2.3), και τα υπόλοιπα 5 ως περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Πίνακας 2.4).

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
WNLs 513-15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 528-15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 537-15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 555-15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 558-15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 911-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 1026-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 1100-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 1941-14	αρνητικό για HPV-	ThinPrep	Νοσοκομείο

	16		ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 1955-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 2061-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 2193-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
WNLs 2179-14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 2.1 Δεκατρία κλινικά δείγματα αρνητικά για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3515	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3570	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3571	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3603	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3841	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3611	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3807	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
LG 900-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 912-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 105-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 2095-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 357-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT10	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

ATT14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
796	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ

Πίνακας 2.2 Δέκα επτά κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
AG 3674	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3592	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3539	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3623	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3624	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
ATT 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ 7	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 11	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
HG 2420-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
HG 153-15	Υψηλού βαθμού	ThinPrep	Πανεπιστημιακό

	δυσπλασία		νοσοκομείο Λάρισας
HG 162-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 532-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 2541-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 500-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 889-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ2	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο

Πίνακας 2.3 Είκοσι δύο κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Δ59	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ60	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ61	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ62	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ63	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο

Πίνακας 2.4 Πέντε κλινικά δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

2.2. Εκχύλιση DNA

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, ανάλογα με το είδος του δείγματος (ThinPrep ή βιοψία τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη).

2.2.1. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml, 10μl γλυκογόνου(100mg/ml), 300μl Lysis Buffer GuSCN (σύσταση: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate) και 100μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), τα σωληνάρια αναδεύτηκαν ισχυρά και πραγματοποιήθηκε επώαση στους -20°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000rcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% (-20°C). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 14.000 rcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού ελεύθερου DNAσων και RNAσων. Τέλος, το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση [160].

2.2.2. Εκχύλιση DNA από μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη

Με τη χρήση νυστεριού απομακρύνθηκαν τομές τραχηλικού ιστού, διαμέτρου 5-10 μm, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η διαδικασία απομάκρυνσης της παραφίνης κατά την οποία προστέθηκαν 400μl ξυλόλης σε κάθε σωλήνα και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 13.000 rcf για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400μl αιθανόλης (100%). Ακολούθησε άλλη μια ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000 rcf για 5 min στους 4 °C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ξυλόλης. Το ίζημα επώαστηκε στους 50 °C για μισή ώρα έτσι ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Εν τέλει , η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2.3 Ταυτοποίηση των δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα ακολούθησε μία Multiplex-PCR. Η PCR αυτή επιτρέπει την γρήγορη ταυτοποίηση των τύπων HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 και 66. Για την εκτέλεση της έχουν σχεδιαστεί τρία διαφορετικά μείγματα εκκινητών, καθένα από τα οποία ανιχνεύει τρεις από τους παραπάνω τύπους HPV. Πιο αναλυτικά, το PrimerMix I περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 16, 45, και 66. Αντίστοιχα, το PrimerMix II περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 18, 33, και 35 και το PrimerMix III για τους 35, 31 και 51. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν σε μια περιοχή του γονιδίου L1 του ιού. Καθώς το γονίδιο αυτό είναι εξαιρετικά συντηρημένο μεταξύ των HPV οι εκκινητές για τους στενά συγγενικούς ιούς σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να υπάρχουν τουλάχιστον δύο mismatch στις τελευταίες 5 βάσεις του 3' άκρου τους. Κάθε PrimerMix περιέχει επιπλέον ένα ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο της β-ακτίνης, που λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας [161].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο το PrimerMix I καθώς στόχος ήταν η επιβεβαίωση της παρουσίας του HPV16. Επίσης, με την παρουσία των εκκινητών β-ακτίνης ελέγχθηκε παράλληλα η ορθότητα και η ποιότητα της απομόνωσης του DNA καθώς και η ύπαρξη αναστολέων της PCR. Επίσης, παράλληλα με τα κλινικά δείγματα εξετάστηκαν κύτταρα των καρκινικών κυτταρικών σειρών CaSki και SiHa ως θετικοί μάρτυρες για τον HPV16.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν PCR
β-ακτίνη	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	498 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	
HPV-16	HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291 bp
	HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV-45	HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233 bp
	HPV45 L1R	CCACGACCAATTTCCATACC	
HPV-66	HPV66 L1F	CGCCGTAAACGTATTCCTA	168 bp
	HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Πίνακας 2.5 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην MultiplexPCR

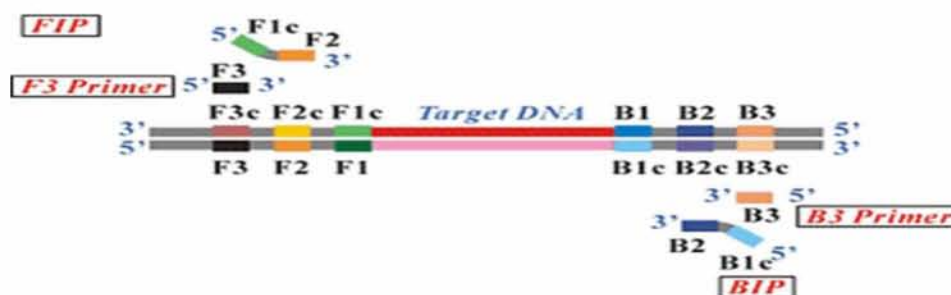
Το PrimerMix I περιείχε 25pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών και 10pmol του ζεύγους β-ακτίνης. Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε το μείγμα των εκκινητών, 5X KAPA2G Buffer A (KAPA, Boston, Massachusetts, USA) το οποίο περιείχε 2mM MgCl₂, 1.2mM dNTPs και 0.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA2GFast DNA polymerase, KAPA, Boston, Massachusetts, USA).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 1 min. Για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 58 °C για 50 sec, επέκταση στους 72 °C για 10 sec. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 1 min.

Η ταυτοποίηση των θετικών για HPV-16 δειγμάτων έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2%.

2.4. Σχεδιασμός των εκκινητών

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των HPV-16 ιών μέσω της τεχνικής της LAMP, ήταν απαραίτητο να σχεδιαστούν τα κατάλληλα εκκινητικά μόρια. Ο σχεδιασμός έγινε στο γονίδιο E6 του ιού HPV-16 με βάση την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους, με τη χρήση του προγράμματος Primer Explorer V4. Γενικά στη LAMP, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε δύο, είτε τρία ζεύγη εκκινητών. Στην παρούσα εργασία, έγινε χρήση δύο ζευγών εκκινητών, των εξωτερικών HPV-16 F3/HPV-16 B3 και των εσωτερικών HPV-16 FIP/HPV-16 BIP. Ο FIP και ο BIP είναι σύνθετοι εκκινητές και όπως φαίνεται τόσο στην εικόνα 2.1, όσο και στον πίνακα 2.6, προκύπτουν από το συνδυασμό δύο επιμέρους εκκινητών, των F2/F1c και των B2/B1c αντίστοιχα [162,163].



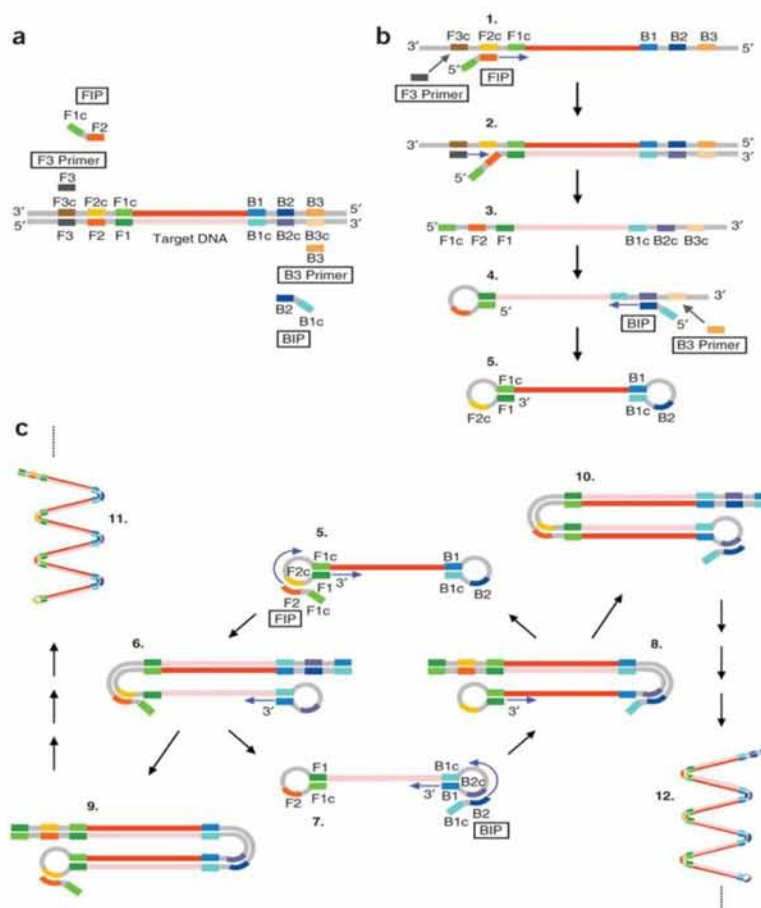
Εικόνα 2.1: Θέσεις υβριδισμού των εκκινητών της LAMP [164].

Εκκινητές	Αλληλουχία	Θέση
F3	GGAACAACATTAGAACAGCA	274-293
B3	CGTGTTCTTGATGATCTGCA	439-458
FIP	ACACAGTGGCTTTTGACAGTT-ATACAACAAACCGTTGTGTGA	42 mer
BIP	CTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGG-ACAAGACATACATCGACCG	43 mer
F2	ATACAACAAACCGTTGTGTGA	294-314
F1c	ACACAGTGGCTTTTGACAGTT	334-354
B2	ACAAGACATACATCGACCG	420-438
B1c	CTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGG	356-379

Πίνακας 2.6: Οι αλληλουχίες και η θέση των εκκινητών της LAMP.

2.5. LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

Η LAMP είναι μία απλή, γρήγορη, ειδική και χαμηλού κόστους τεχνική ενίσχυσης ενός τμήματος DNA στόχου. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου.



Εικόνα 2.2: Οι διαφορετικές δομές των προϊόντων της LAMP. a) Ο αρχικός υβριδισμός των εκκινητών στο στόχο. b) Η δημιουργία της βασικής δομής θηλιάς της LAMP. c) Οι διαφορετικές δομές που προκύπτουν κατά την ενίσχυση της βασικής θηλιάς [164].

Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας μία ειδική πολυμεράση, την Bst3.0 η οποία έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται $10^9 - 10^{10}$ φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα [165,166].

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.2 μέσω της LAMP δημιουργείται αρχικά η βασική δομή θηλιάς, η οποία προκύπτει από τη συμβολή και των τεσσάρων εκκινητών. Στη συνέχεια, η βασική θηλιά ενισχύεται και από αυτό το στάδιο και

έπειτα στην αντίδραση συμμετέχουν μόνο οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Αποτέλεσμα της ενίσχυσης αποτελεί η δημιουργία πολλών και διαφορετικών δομών.

Αναλυτικότερα, στην αρχή της διαδικασίας το DNA στόχος και τα αντιδραστήρια επωάζονται στους 60-65 °C. Στο πρώτο βήμα καθώς το δίκλωνο DNA είναι σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε θερμοκρασία περίπου 65 ° C, ένας από τους εκκινητές της LAMP μπορεί συνδεθεί με την ελεύθερη αλληλουχία του δίκλωνου DNA στόχου και αρχίζει την σύνθεση του DNA χρησιμοποιώντας την DNA πολυμεράση με δραστηριότητα εκτόπισης κλώνου, εκτοπίζοντας και απελευθερώνοντας ένα μονόκλωνο DNA. Με τη μέθοδο LAMP, σε αντίθεση με την PCR, δεν υπάρχει ανάγκη για θερμική μετουσίωση του δίκλωνου DNA σε ξεχωριστό βήμα. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο εκκινητής FIP συνδέεται σε κάθε ελεύθερο μονόκλωνο μητρικό κομμάτι DNA. Στο δεύτερο βήμα συντίθεται ένας συμπληρωματικός προς το εκμαγείο κλώνος DNA μέσω της δραστηριότητας της DNA πολυμεράσης με δραστηριότητα εκτόπισης κλώνου, αρχίζοντας από το 3 'άκρο της περιοχής F2 του FIP. Στο τρίτο βήμα ο εκκινητής F3 συνδέεται στην περιοχή F3c, εκτός του FIP, πάνω στο DNA στόχο και αρχίζει τη σύνθεση μέσω εκτόπισης του DNA κλώνου, απελευθερώνοντας τον FIP-συνδεδεμένο συμπληρωματικό κλώνο. Στο τέταρτο βήμα σχηματίζεται ένα δίκλωνο κομμάτι DNA από τον κλώνο του DNA που συντίθεται από τον εκκινητή F3 και τον μητρικό κλώνο DNA. Έπειτα, ο FIP-συνδεδεμένος συμπληρωματικός κλώνος απελευθερώνεται ως μια μονόκλωνη αλυσίδα λόγω της εκτόπισης από τον κλώνο του DNA που συντίθεται από τον εκκινητή F3. Στη συνέχεια, αυτό το ελεύθερο μονόκλωνο DNA δημιουργεί μια δομή στελέχους-θηλιάς στο 5 'άκρο, λόγω των συμπληρωματικών περιοχών F1c και F1. Ύστερα, η δομή αυτή χρησιμεύει ως πρότυπο για την σύνθεση του DNA που ξεκινά από τον εκκινητή BIP και την επακόλουθη σύνθεση του DNA μέσω εκτόπισης κλώνου από τον B3 εκκινητή. Ο BIP συνδέεται στον κλώνο DNA που παράχθηκε στο προηγούμενο βήμα και ξεκινώντας από το 3' άκρο του εκκινητή συντίθεται το νέο DNA. Μέσω αυτής της διαδικασίας, το DNA επανέρχεται από μία δομή βρόχου σε μια γραμμική δομή. Ο εκκινητής B3 συνδέεται στο εξωτερικό του BIP και επαναλαμβάνεται η διαδικασία όπως και προηγουμένως με τον εκκινητή FIP. Ο συνδεδεμένος με τον εκκινητή BIP συμπληρωματικός κλώνος που παράχθηκε σχηματίζει μια δομή με στέλεχος-βρόχο σε κάθε άκρο, το οποίο μοιάζει με μια δομή αλτήρα. Η δομή αυτή χρησιμεύει ως δομή εκκίνησης για τον κύκλο ενίσχυσης στη

μέθοδο LAMP. Στον κύκλο ενίσχυσης η δομή εκκίνησης χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη δημιουργία άλλων κλώνων DNA με δομές παρόμοιες με αυτές από τις οποίες προέκυψε αυτοκαταλύοντας την εκκίνηση σχηματισμού νέου κλώνου DNA. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, οι διαφόρων μεγεθών δομές που προκύπτουν αποτελούνται από εναλλάξ ανεστραμμένες επαναλήψεις της αλληλουχίας στόχου που σχηματίζονται στον ίδιο κλώνο [164].

Η αντίδραση της LAMP πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, σε τελικό όγκο 25μl. Κάθε μικροσωληνάριο περιείχε: 3μl DNA του στόχου, dNTPs 5,6mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, MgSO₄ 4mM, FIP 1,5 pmol/μl, BIP 1,5 pmol/μl, F3 0,25 pmol/μl, B3 0,25 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, ddH₂O μέχρι τα 25μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

1. Επώαση στους 65°C για 40 λεπτά
2. Επώαση στους 80 °C για 5 λεπτά

Κατά τη διάρκεια του πρώτου βήματος πραγματοποιείται η ενίσχυση του στόχου και κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος γίνεται η απενεργοποίηση του ενζύμου.

Η LAMP είναι μια τεχνική ενίσχυσης DNA που διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα. Πρώτα απ' όλα το γεγονός ότι πρόκειται για ισοθερμική μέθοδο καθιστά δυνατή την πραγματοποίηση της χωρίς τη χρήση θερμοκυκλοποιητή συνεπώς το κόστος διεξαγωγής της είναι αρκετά χαμηλό. Επιπλέον, είναι γρήγορη, επειδή δεν είναι απαραίτητη η εναλλαγή της θερμοκρασίας και το κατώφλι της αντίδρασης μπορεί τυπικά να επιτευχθεί σε 30-40 λεπτά. Ωστόσο, το όριο ανίχνευσής της και η απόδοσή της είναι όμοια με αυτά της PCR, γεγονός που καθιστά την χρήση της ακόμη πιο προσιτή. Ένα ξεχωριστό πλεονέκτημα της LAMP αποτελεί η υψηλή εξειδίκευσή της για την επιθυμητή αλληλουχία DNA στόχου, η οποία αναγνωρίζεται από το μηχανισμό μοναδικής ενίσχυσης της και την σύνδεση των πολλαπλών εκκινητών ως απαίτηση για ενίσχυση της ειδικής αλληλουχίας. Το τελευταίο χαρακτηριστικό εξαλείφει τον σχηματισμό διμερών εκκινητών και τις μη ειδικές ενισχύσεις.

2.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης σε συγκέντρωση 1,2%. Συγκεκριμένα 0,48g αγαρόζης και 40ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 5µl προϊόντος της LAMP αναμιγνύονται με 1 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

2.7. Ενίσχυση των E6-E7 γονιδίων με PCR

Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ενίσχυση με PCR για τα γονίδια E6-E7 του HPV16. Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, “in vitro”. Μέσα σε λίγες ώρες, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται αποκτώντας ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων, ο οποίος εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών κλώνων DNA.

Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες

του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
HPV-16 41(forward)	AGC CAC CCA GAA AGT TAC CA
HPV-16 757 (reverse)	ATG GGG CAC ACA ATT CCT AG

Πίνακας 2.6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με βάση την πρότυπη αλληλουχία πρότυπου στελέχους του HPV16 και η αρίθμηση των θέσεων των νουκλεοτιδίων βασίστηκε επίσης στην αλληλουχία αυτή. Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ενισχύσει το γονίδιο E6 και το γονίδιο E7 του HPV16. Στο συγκεκριμένο βήμα μας ενδιέφερε το τμήμα του γονιδίου E6 που επρόκειτο να ενισχυθεί να περιέχει το τμήμα όπου υβριδίζονται οι εκκινητές που σχεδιάσαμε παραπάνω για την μέθοδο LAMP. Συνεπώς μέσω του προγράμματος για τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινητών αναζητούσαμε συμπληρωματικές αλληλουχίες εκκινητών που να βρίσκονται όσο το δυνατό πιο κοντά και εκατέρωθεν των εξωτερικών εκκινητών της LAMP (F₃/B₃). Έτσι, ο πρόσθιος εκκινητής υβριδίζεται 20 ζεύγη βάσεων καθοδικά του σημείου έναρξης μεταγραφής του E6 γονιδίου του HPV16, ενώ ο αντίστροφος εκκινητής υβριδίζεται 10 ζεύγη βάσεων ανοδικά από το 3' άκρο του E7 γονιδίου και το τμήμα που προκύπτει μήκους 715bp περιλαμβάνει το τμήμα που ενισχύεται στη μέθοδο LAMP.

Όσον αφορά στα στάδια της PCR, το πρώτο στάδιο αποτελεί η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Έπειτα, «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές ή “primers”) στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Στο τρίτο στάδιο, με τη δράση του ενζύμου Paq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και ο κλώνος επεκτείνεται. Έτσι σχηματίζονται δύο νέοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτούς του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

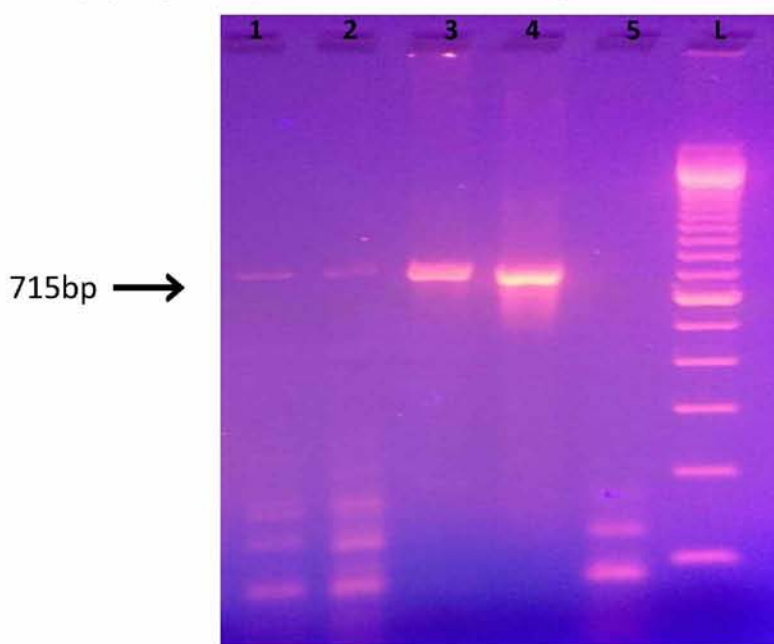
Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl και σε τελικό όγκο 50μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Το μείγμα της PCR περιείχε 25 pmol από κάθε εκκινητή, 1x Paq DNA pol Buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs και 2 U Paq DNA

Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl DNA αντίστοιχο του κάθε δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες: 40 κύκλοι των 40s στους 95°C, 50s στους 55°C και 1min στους 72°C. Ο πρώτος κύκλος διεκπεραιώθηκε μετά από ένα βήμα μετουσίωσης για 2 λεπτά στους 95°C και ο τελευταίος κύκλος ακολουθήθηκε από ένα βήμα επιμήκυνσης για 5 λεπτά στους 72°C.

2.8. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από την αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο προκειμένου να δοθεί η δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν σε «πηγαδάκια» 10 μl από κάθε προϊόν της αντίδρασης PCR αφού πρώτα αναμίχθηκαν με 2-3 μl χρωστικής ουσίας. Στη συνέχεια, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 130 V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Το “ύψος” σε ζεύγη βάσεων των τμημάτων εξακριβώθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen UK).



Εικόνα 2.3: Ενδεικτική φωτογραφία με το αποτέλεσμα της PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 715 bp. Στο «πηγαδάκι» με αρίθμηση 5 έχει φορτωθεί το αρνητικό control που περιέχει ddH₂O.

2.9. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR (agarose extraction)

Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων αυτών. Μετά την έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV, οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από αυτό, τοποθετήθηκαν σε eppendorf των 1,5ml και ακολούθησε ο καθαρισμός με τη χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του καθαρισμού μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων του καθαρισμού.

2.10. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR

Η μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR διακρίνεται σε τέσσερα στάδια και πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η μοναδικότητα και η ακρίβεια της ενίσχυσης του συγκεκριμένου μορίου DNA στόχου, ώστε στη συνέχεια να μπορέσει να καθοριστεί ο αριθμός αντιγράφων του ιού μέσω αραιώσεων πλασμιδίων. Αρχικά, γίνεται προσθήκη άκρων A στα τμήματα DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθούν. Έπειτα, πραγματοποιείται η αντίδραση της τοποϊσομεράσης την οποία διαδέχεται ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και τέλος η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

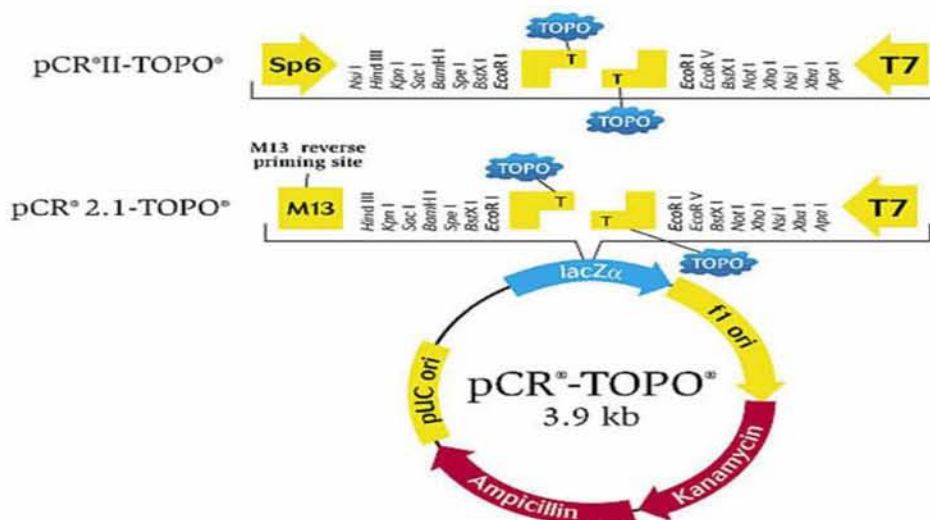
α) Προσθήκη άκρων A

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της τοποϊσομεράσης πρέπει να προηγηθεί το συγκεκριμένο βήμα. Συγκεκριμένα, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μ l τα οποία περιέχουν 7 μ l καθαρισμένου DNA, 5U KAPA Taq Pol , 1X KAPA Taq Buffer, 0,2 mM dATPs και ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από ddH₂O. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 72 °C για 30 min.

β) Αντίδραση τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning):

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1I- TOPO (Life Technologies, USA), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1 μ l φορέα

pCR 2.II-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR/LAMP. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) και των θέσεων κοπής του ενζύμου EcoRI.

γ) Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων:

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε σωληνάρια erppendorf των 2ml. Στη συνέχεια προστίθενται 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων μέσω της διαδικασίας “heat shock”, κατά την οποία τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και ακολούθως τοποθετούνται ξανά στον πάγο για 2 λεπτά.

Οκτακόσια (800μl) θρεπτικού υποστρώματος LB Broth προστίθενται στα προϊόντα του “heat shock” και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό. Έπειτα, γίνεται επίστρωση 150μl καλλιέργειας σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA).

Ακολουθεί ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Αφού αναπτυχθούν οι αποικίες, συλλέγονται οι λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρονται σε 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό.

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιείται με τη χρήση του Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

δ)Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI:

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιείται πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Shiga, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης 2% όπου αναμένεται η ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος.

2.11. Αραιώσεις πλασμιδίων

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων που μπορεί να ανιχνευθούν από το πρωτόκολλο LAMP που δημιουργήσαμε χρειάστηκε από τα αρχικά δείγματα των πλασμιδίων που απομονώσαμε στο προηγούμενο βήμα να πραγματοποιήσουμε σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις. Συγκεκριμένα, σε νέο μικροσωληνάριο εισάγαμε 10μl από το δείγμα που περιείχε την αρχική συγκέντρωση πλασμιδίων και 90μl ddH₂O. Μετά από πολύ καλή ανάδευση με τη βοήθεια του vortex από το νέο μικροσωληνάριο πήραμε 10μl και τα εναποθέσαμε σε ένα καινούριο μικροσωληνάριο εισάγοντας στη συνέχεια στο τελευταίο 90μl ddH₂O δημιουργήσαμε την υποδεκαπλάσια αραιώση. Επαναλλάβαμε την συγκεκριμένη διαδικασία μέχρι την αραιώση 10⁻¹⁰.

2.12. Real-time PCR

Η διαδικασία της Real-time PCR πραγματοποιήθηκε για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αριθμού αντιγράφων σε σχέση με τον κύκλο «θετικοποίησης» (Ct – cycle threshold), ώστε μετέπειτα να προσδιοριστεί η ευαισθησία της LAMP εκφραζόμενη σε αριθμό αντιγράφων, καθώς και ο ακριβής αριθμός αντιγράφων των τριών θετικών δειγμάτων, που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στη μέθοδο LAMP.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία SYBR-Green, κατά την οποία η χρωστική αυτή προσδένεται στα δίκλινα τμήματα DNA εκπέμποντας φθορισμό, ο οποίος ανιχνεύεται στα 510nm.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, ειδικά για Real-Time PCR. Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 20μl και περιείχε τα εξής: 3μl πλασμιδιακού DNA, 1X ROX Low, 1X KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix, 5pmol/μl από τους εκκινητές HPV-16 F₃/HPV-16 B₃ και ddH₂O μέχρι τα 20μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο MX3005 της STRATAGENE στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	-Θερμοκρασία αρχικής αποδιάταξης: 1,5 λεπτό στους 95°C
40 κύκλοι	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 3 δευτερόλεπτα στους 95°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 10 δευτερόλεπτα στους 60°C -Θερμοκρασία επέκτασης: 10 δευτερόλεπτα στους 60°C
1 κύκλος	-Melting Curve Analysis 55°C-95°C

Πίνακας 2.7: Συνθήκες της Real-Time PCR.

2.13. Τελικός έλεγχος κλινικών δειγμάτων με PCR

Για την επιβεβαίωση των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων της LAMP, πραγματοποιήσαμε δύο PCR. Η πρώτη διεξήχθη στοχεύοντας στο γονίδιο E6 με τη χρήση των εξωτερικών εκκινητών της LAMP, HPV-16 F₃/ HPV-16 B₃, ενισχύοντας ένα προϊόν 185 bp.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl και σε τελικό όγκο 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μείγμα από το οποίο προστέθηκαν σε κάθε μικροσωληνάριο 45μl. Το μείγμα της PCR περιείχε 25 pmol από κάθε εκκινητή, 1x Kapa Taq DNA pol Buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs και 2 U Kapa Taq DNA Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 45μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 5μl DNA αντίστοιχο του κάθε δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες: 40 κύκλοι των 30s στους 95°C, 30s στους 51°C και 30sec στους 72°C. Ο πρώτος κύκλος διεκπεραιώθηκε μετά από ένα βήμα μετουσίωσης για 2 λεπτά στους 95°C και ο τελευταίος κύκλος ακολουθήθηκε από ένα βήμα επιμήκυνσης για 1 λεπτό στους 72°C.

Η δεύτερη PCR πραγματοποιήθηκε με στόχο ένα τμήμα του γονιδίου L1 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές HPV-16 L1F/ HPV-16 L1R που χρησιμοποιήθηκαν και παραπάνω για την διεξαγωγή της multiplex PCR και την ταυτοποίηση των δειγμάτων [164]. Το τμήμα DNA που ενισχύθηκε στην συγκεκριμένη αντίδραση είχε μήκος 291bp.

Όπως και στην πρώτη PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl και σε τελικό όγκο 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε και πάλι ένα μείγμα από το οποίο προστέθηκαν σε κάθε μικροσωληνάριο 45μl. Το μείγμα της PCR περιείχε 25 pmol από κάθε εκκινητή, 1x Kapa Taq DNA pol Buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs και 2 U Kapa Taq DNA Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 45μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 5μl DNA αντίστοιχο του κάθε δείγματος.

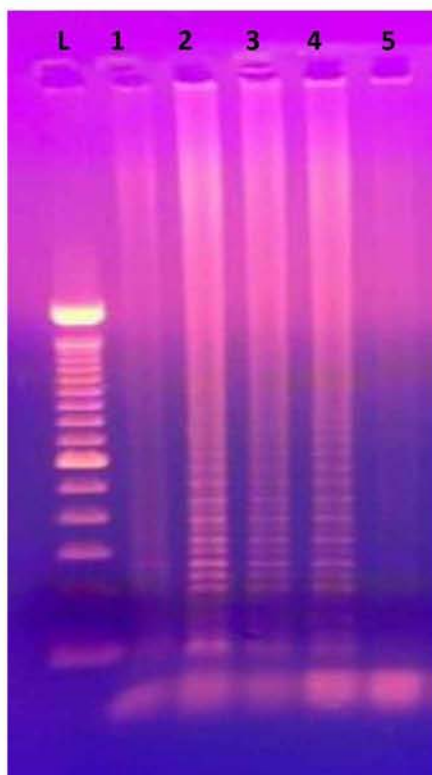
Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες: 40 κύκλοι των 30s στους 95°C, 30s στους 58°C και 30sec στους 72°C. Ο πρώτος κύκλος διεκπεραιώθηκε μετά από ένα βήμα μετουσίωσης για 2 λεπτά στους 95°C και ο τελευταίος κύκλος ακολουθήθηκε από ένα βήμα επιμήκυνσης για 1 λεπτό στους 72°C.

Κεφάλαιο 3^ο

Αποτελέσματα

3.1.Αποτελέσματα της LAMP στα πρότυπα στελέχη

Αρχικά, για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της μεθόδου LAMP χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα οι αραιώσεις πλασμιδίων τα οποία περιείχαν ως ένθεμα «DNA στόχο» από κυτταρικές σειρές SiHa και Caski. Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές είναι γνωστό ότι είναι μολυσμένες με τον ιό HPV-16 και το DNA που προέρχεται από αυτές χρησιμοποιήθηκε τόσο για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της μεθόδου όσο και για τον καθορισμό της ευαισθησίας της, καθώς οι HPVs δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες. Συνεπώς δεν καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός των αντιγράφων του ιού μέσω της μεθόδου CCID50.



Δείγμα	DNA	Αποτέλεσμα
1	ddH2O	–
2	SiHa 10 ⁻⁶ (1000)	+
3	SiHa 10 ⁻⁷ (100)	+
4	SiHa 10 ⁻⁸ (10)	+
5	SiHa 10 ⁻⁹ (1)	–

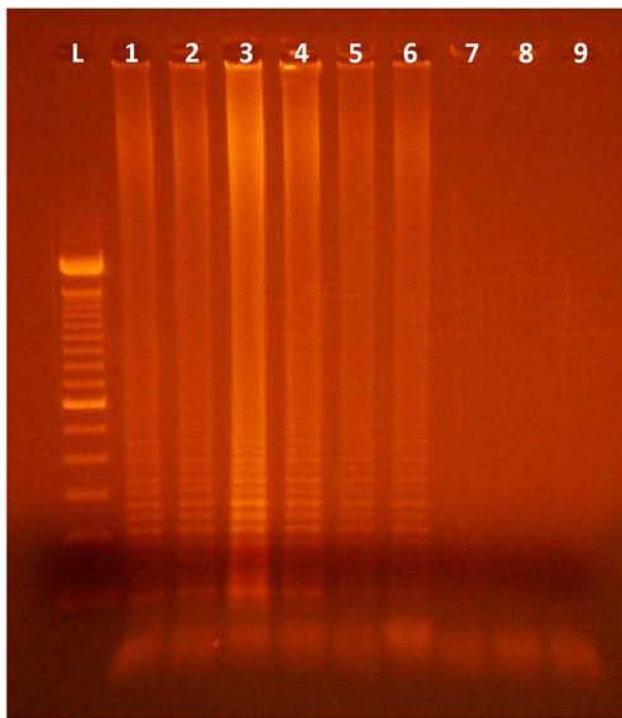
Πίνακας 3.1: Πίνακας ενδεικτικών δειγμάτων που αντιστοιχούν σε αραιώσεις πλασμιδίων που περιέχουν DNA από κύτταρα SiHa. Στις παρενθέσεις αναγράφεται ο αριθμός των αντιγράφων που περιέχεται σε κάθε αραιώση όπως αυτός προέκυψε μέσω της μεθόδου Real time PCR. Το (+) σημαίνει πως τα συγκεκριμένα δείγματα κατάφεραν να ανιχνευθούν με αυτή τη μέθοδο και το (-) ότι δεν ανιχνεύθηκαν. Το ddH2O χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control.

Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων του πίνακα 3.1. όπου απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές πολλαπλές ζώνες που δίνουν τα θετικά δείγματα στη μέθοδο LAMP.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μέσω της μεθόδου LAMP θετικό αποτέλεσμα έδωσαν τα δείγματα που περιείχαν πάνω από 10 αντίγραφα του ιού HPV-16.

3.2. Αποτελέσματα της LAMP στα κλινικά δείγματα

Παρακάτω φαίνεται η εικόνα που προκύπτει έπειτα από την ηλεκτροφόρηση ορισμένων κλινικών δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν μέσω της LAMP. Τα κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση του πρωτοκόλλου που δημιουργήθηκε για τη LAMP. Παρατηρούμε πως στο πήκτωμα δεν εμφανίζεται μία χαρακτηριστική ζώνη συγκεκριμένου μεγέθους, όπως στη συμβατική PCR, αλλά προκύπτει πλήθος ζωνών, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη όλων αυτών των διαφορετικών δομών που περιγράφηκαν προηγουμένως κατά τη διεξαγωγή της LAMP.



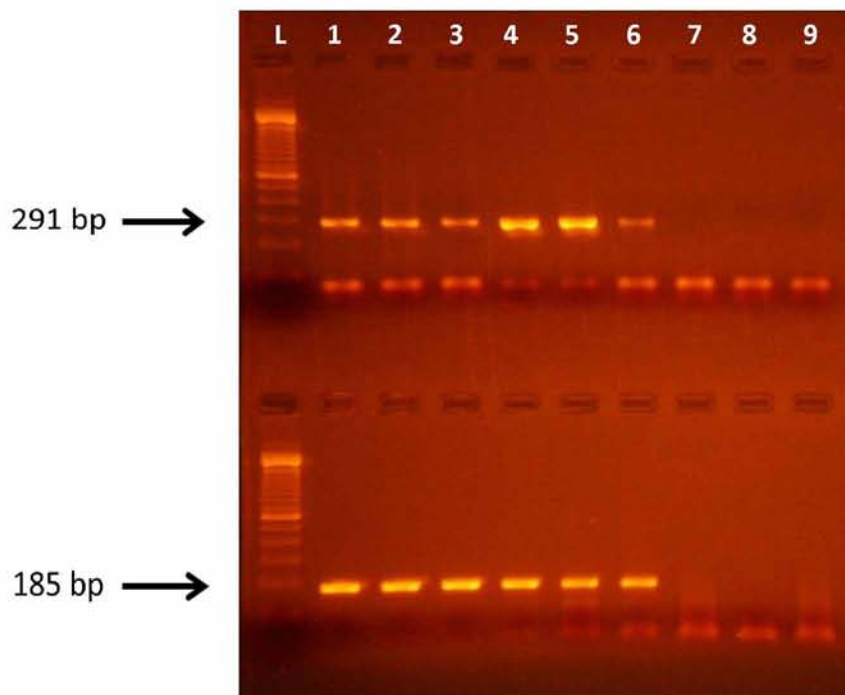
Δείγμα	DNA	Αποτέλεσμα
1	AG3807	+
2	AG3841	+
3	ΠΝΑ10	+
4	ΠΝΑ11	+
5	Δ2	+
6	Δ61	+
7	WNLs 513-15	-
8	WNLs 528-15	-
9	WNLs 537-15	-

Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των θετικών και αρνητικών δειγμάτων του πίνακα 3.2. μετά την εφαρμογή της μεθόδου LAMP.

Πίνακας 3.2: Πίνακας ενδεικτικών θετικών και αρνητικών κλινικών δειγμάτων για τον έλεγχο του πρωτοκόλλου της LAMP. Το (+) σημαίνει πως τα συγκεκριμένα δείγματα ανιχνεύθηκαν με αυτή τη μέθοδο και το (-) ότι δεν ανιχνεύθηκαν. Το ddH₂O χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control.

3.2. Αποτελέσματα της PCR στα κλινικά δείγματα για τα γονίδια E6 και L1

Προκειμένου να επαληθευθεί η παρουσία του τμήματος του HPV-16 που ενισχύθηκε μέσω της μεθόδου LAMP στα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε μια PCR με εκκινητές τους εξωτερικούς εκκινητές της LAMP F₃/B₃ σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω ενισχύοντας το τμήμα 185bp του γονιδίου E6, το οποίο ενισχύεται και μέσω της μεθόδου LAMP. Επίσης, με στόχο την επαλήθευση των θετικών και αρνητικών για HPV-16 κλινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ακόμη μια PCR στο γονίδιο L1 με εκκινητές L1F/L1R ενισχύοντας τμήμα 291bp και συνθήκες οι οποίες περιγράφηκαν παραπάνω [161].



Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της PCR για το γονίδιο L1 στο επάνω τμήμα της εικόνας και της PCR για το γονίδιο E6 στο κάτω τμήμα της εικόνας. Πρόκειται για τα θετικά και αρνητικά κλινικά δείγματα του πίνακα 3.2. τα οποία φορτώθηκαν με την ίδια σειρά που απεικονίζονται και στην εικόνα 3.2. και έδωσαν το ίδιο θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα αντίστοιχα τόσο στη LAMP όσο και στις δύο PCR.

3.3. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Αποτελέσματα LAMP	Αποτελέσματα PCR με εκκινητές F3/B3	Αποτελέσματα PCR με εκκινητές L1F/L1R	Real time PCR (αντίγραφα)
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3515	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3570	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3571	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3603	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3841	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3611	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3807	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
LG 900-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
LG 912-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
LG 105-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
LG 2095-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
LG 357-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ATT10	Χαμηλού βαθμού	Θετικό	Θετικό	Θετικό	

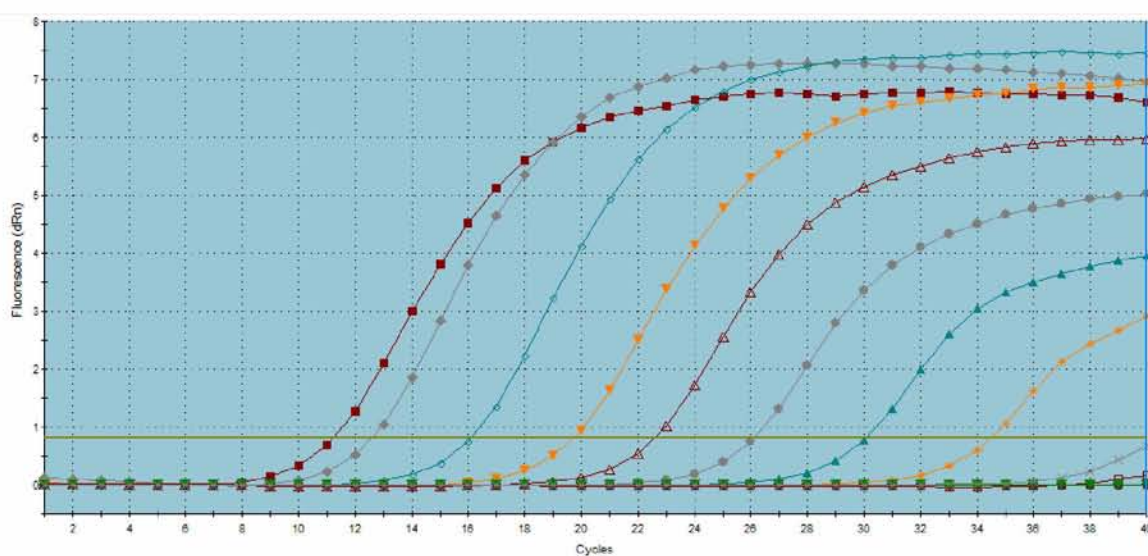
	δυσπλασία				
ATT14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ATT15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Αρνητικό	Θετικό	Θετικό	3,37
796	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3674	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3592	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3539	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3623	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3624	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ATT 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ΠΙΝΑ 7	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ΠΙΝΑ 10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
ΠΙΝΑ 11	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 2420-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 153-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 162-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 532-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 2541-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 500-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
HG 889-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Αρνητικό	Θετικό	Θετικό	2,02

Δ2	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ59	καρκίνος	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ60	καρκίνος	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ61	καρκίνος	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ62	καρκίνος	Θετικό	Θετικό	Θετικό	
Δ63	καρκίνος	Αρνητικό	Θετικό	Θετικό	0,83
WNLs 513-15	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 528-15	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 537-15	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 555-15	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 558-15	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 911-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 1026-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 1100-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 1941-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 1955-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 2061-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 2193-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	
WNLs 2179-14	αρνητικό για HPV-16	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων LAMP και PCR(στο γονίδιο E6 και στο γονίδιο L1) καθώς και των αντιγράφων των δειγμάτων που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην αντίδραση LAMP. Ο αριθμός των αντιγράφων υπολογίστηκε με τη μέθοδο Real time PCR και την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

3.4. Εύρεση αριθμού αντιγράφων με Real time PCR

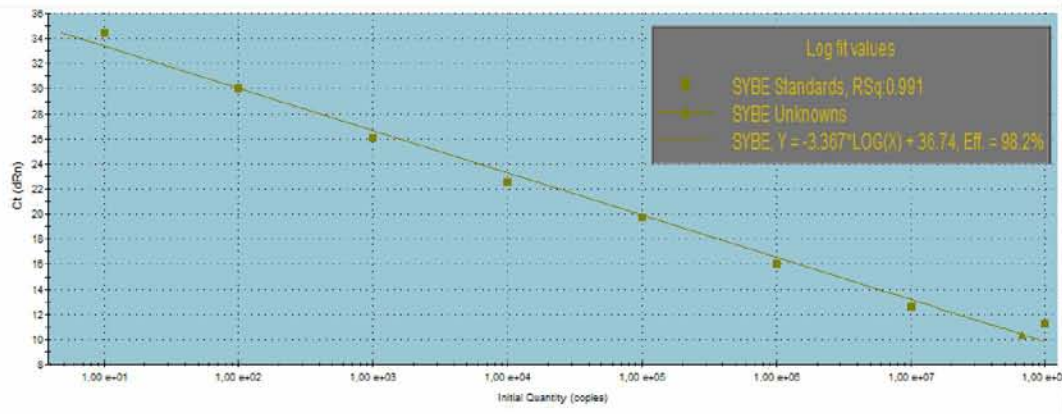
Έπειτα από την πραγματοποίηση Real time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων που δημιουργήσαμε, τα οποία περιείχαν τμήμα DNA των γονιδίων E6 και E7 του ιού HPV-16 και είχαν απομονωθεί από τις κυτταρικές σειρές SiHa και Caski, προσδιορίσαμε την αραιώση που περιείχε το ένα αντίγραφο. Η αραιώση αυτή καθορίστηκε ότι είναι η 10^{-9} για τις αραιώσεις πλασμιδίων από κύτταρα SiHa και 10^{-8} για τις αραιώσεις πλασμιδίων από κύτταρα Caski. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η εικόνα των αποτελεσμάτων της Real time PCR για τις αραιώσεις των πλασμιδίων από κύτταρα SiHa. Η αραιώση που περιείχε το ένα αντίγραφο ορίστηκε ως η τελευταία που «θετικοποιείται», περνά δηλαδή το κατώφλι (Ct – cycle threshold). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε επίσης ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, η καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα αυτό βρίσκεται κάτω από το κατώφλι και αναπαριστάται με μπορντό χρώμα.



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα της μεθόδου Real time PCR για τις αραιώσεις των πλασμιδίων που περιέχουν DNA του ιού HPV-16 το οποίο έχει απομονωθεί από κύτταρα SiHa. Η δεύτερη καμπύλη με πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί στην αραιώση που περιέχει το ένα αντίγραφο.

Δείγμα	μπορντό	γκρι	γαλάζιο	πορτοκαλί	κόκκινο	Γκρι (σκούρο)	μπλε	πορτοκαλί	γκρι
DNA	SiHa [10^{-2}]	SiHa [10^{-3}]	SiHa [10^{-4}]	SiHa [10^{-5}]	SiHa [10^{-6}]	SiHa [10^{-7}]	SiHa [10^{-8}]	SiHa [10^{-9}]	SiHa [10^{-10}]

Πίνακας 3.4: Πίνακας αναφοράς των δειγμάτων όπου περιέχονται οι αραιώσεις των πλασμιδίων που περιέχουν DNA του ιού HPV-16 το οποίο έχει απομονωθεί από κύτταρα SiHa, όπως αυτές παρουσιάζονται στην εικόνα 3.4. με σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά.



Εικόνα 3.5: Απεικόνιση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε , ύστερα από τη διεξαγωγή της Real-time PCR για τις αραιώσεις πλασμιδίων, που περιέχουν τμήμα DNA των γονιδίων E6-E7 του ιού HPV-16 το οποίο έχει απομονωθεί από κύτταρα SiHa , από 1 έως 10^7 αντίγραφα.

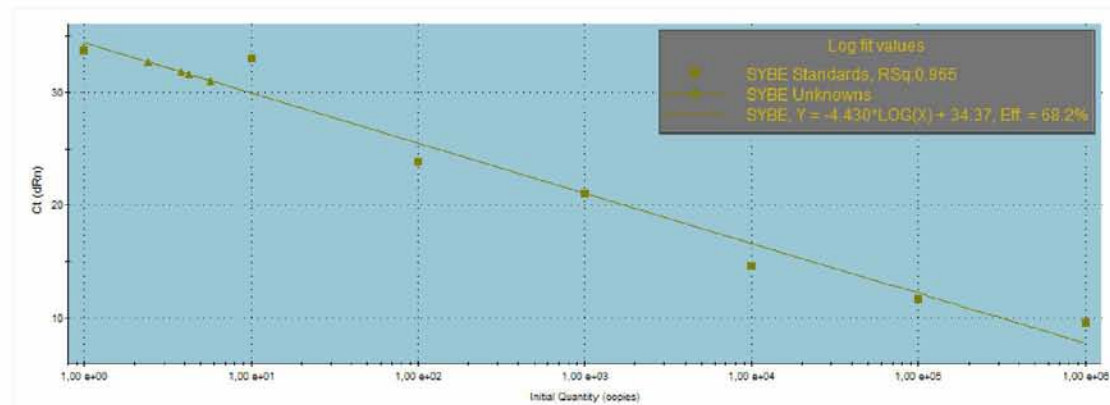
3.5. Προσδιορισμός της ευαισθησίας της μεθόδου LAMP

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του ενός αντιγράφου στις αραιώσεις των πλασμιδίων (εδάφιο 3.3.) και τα αποτελέσματα που έδωσε η μέθοδος LAMP για τις γνωστές πλέον αραιώσεις των πλασμιδίων σύμφωνα με τον πίνακα και την εικόνα 3.1., ως όριο ανίχνευσης της μεθόδου LAMP καθορίζονται τα 10 αντίγραφα του ιού HPV-16, με τη χρήση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου.

3.6. Προσδιορισμός αντιγράφων των δειγμάτων με αρνητικό αποτέλεσμα στη LAMP

Παρόλο που η εφαρμογή του πρωτοκόλλου αποδείχθηκε ιδιαίτερα επιτυχής για τα κλινικά δείγματα που δοκιμάστηκαν για την επαλήθευσή της, κατά την εφαρμογή της μεθόδου LAMP καταγράφηκαν τρεις αποκλίσεις. Συγκεκριμένα, τρία από τα κλινικά δείγματα τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα κατά τον έλεγχο με PCR στο γονίδιο E6 και στο γονίδιο L1 για τον HPV-16, στη LAMP έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα. Για να εξηγηθεί το γεγονός αυτό ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου Real time PCR για τα δείγματα αυτά προκειμένου να προσδιοριστούν τα αντίγραφα του ιού που περιέχονται σε καθένα από τα δείγματα αυτά με βάση την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από τις αραιώσεις των πλασμιδίων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν ήταν αυτά με κωδικό ATT15, HG 889-14 και Δ63. Τα αντίγραφα που περιείχε το κάθε δείγμα ήταν 3,37 ,2,02 και 0,83 αντίστοιχα.

Εφόσον και στα τρία αυτά κλινικά δείγματα τα αντίγραφα που περιέχονταν ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10 αντιγράφων που προσδιορίσαμε για τη μέθοδο LAMP, η απόκλιση αυτή είναι αναμενόμενη και πειραματικά αποδεκτή.



Εικόνα 3.6: Ο υπολογισμός των αντιγράφων που περιείχαν τα τρία δείγματα που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στη μέθοδο LAMP, ενώ και στις δύο PCR έδωσαν θετικό αποτέλεσμα έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη που είχε δημιουργηθεί μέσω της εφαρμογής της μεθόδου Real time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων που περιέχουν τμήμα DNA των γονιδίων E6-E7 του ιού HPV-16 το οποίο έχει απομονωθεί από κύτταρα SiHa, από 1 έως 10^7 αντίγραφα.

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι παγκοσμίως ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, και προκαλείται, όπως είναι γνωστό, κατά κύριο λόγο από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV-16. Ο HPV-16 ανήκει στην οικογένεια των Papillomaviridae, το γονιδιώμά του αποτελείται από δίκλωνο κυκλικό DNA, μήκους 7.904bp και δεν περιβάλλεται από εξωτερικό περίβλημα.

Σήμερα λόγω της ύπαρξης προληπτικού ετήσιου ελέγχου (pap test) καθώς και εμβολίου για κάποια από τα στελέχη των HPVs στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο HPV-16, οι περιπτώσεις κλινικών εκδηλώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν μειωθεί αισθητά στις ανεπτυγμένες χώρες. Παρόλα αυτά όμως, στις αναπτυσσόμενες χώρες ο HPV-16 και οι υπόλοιποι τύποι HPV υψηλής επικινδυνότητας συνεχίζουν να προσβάλουν σημαντικό ποσοστό του γυναικείου πληθυσμού και να αποτελούν απειλή για τη ζωή τους, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Εξαιτίας, λοιπόν, του αυξημένου ποσοστού ετήσιων θανάτων που προκαλούν οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων και ειδικά ο τύπος HPV-16 η έγκυρη και όσο το δυνατόν ταχύτερη διάγνωσή τους αποτελεί ζήτημα μείζονος σημασίας για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου. Την ανάπτυξη κυτταρολογικών τεχνικών διάγνωσης παρεμποδίζει το γεγονός ότι ο κύκλος ζωής του ιού ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του επιθηλίου τα οποία μολύνει. Λόγω αυτού είναι αδύνατο να αναπτυχθεί ο ιός σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες στο χώρο του εργαστηρίου. Επιπλέον, τα ορολογικά τεστ, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν περιορισμένη ακρίβεια. Συνεπώς, το ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για την διάγνωση της HPV λοίμωξης.

Στα διαγνωστικά εργαστήρια ακόμη και σήμερα ως τεχνικές ρουτίνας χρησιμοποιούνται το τεστ Παπανικολάου και το Hybrid Capture II test. Βέβαια έχει αποδειχθεί ότι η χρήση μοριακών τεχνικών που στηρίζονται στη μέθοδο PCR αποτελούν πολύ πιο ακριβείς, ευαίσθητες και αποτελεσματικές μεθόδους για την ανίχνευση των μολύνσεων από HPV ιούς. Ωστόσο, κάθε μια από αυτές, όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 1.13., έχει τα μειονεκτήματά της [158,159]. Το πιο σύνηθες μειονέκτημα όσον αφορά όλες τις παραπάνω μοριακές μεθόδους είναι πως ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ανίχνευση μέσω αυτών των τεχνικών είναι αρκετά

δαπανηρός και οι μέθοδοι οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων είναι περίπλοκες. Οπότε, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν νέες μοριακές τεχνικές οι οποίες να είναι γρήγορες, εύκολες και χαμηλού κόστους.

Μία εναλλακτική τεχνική για την ανίχνευση των ιών HPV μπορεί να αποτελέσει η LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Η μέθοδος LAMP αποτελεί μία σχετικά νέα τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία πραγματοποιείται σε ένα βήμα. Η αντίδραση της LAMP βασίζεται στην ενεργότητα εκτόπισης κλώνου της Bst DNA πολυμεράσης, του ενζύμου που χρησιμοποιείται κατά τη διεξαγωγή της LAMP. Πρόκειται για μια ισοθερμική τεχνική, της οποίας το εύρος θερμοκρασίας κυμαίνεται από 60 °C έως 65 °C. Το γεγονός αυτό προσδίδει το πλεονέκτημα ότι δεν είναι απαραίτητη η χρήση θερμοκυκλοποιητή για τη διεξαγωγή της, καθώς η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επωαστήρα ή υδατόλουτρο. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικοί εκκινητές που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου. Επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση έξι εκκινητών οπότε επιτυγχάνεται μεγαλύτερη εξειδίκευση όμως αυξάνεται η πολυπλοκότητα της μεθόδου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται $10^9 - 10^{10}$ φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Συνεπώς, η οπτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί έκτος από τις συμβατικές μεθόδους, όπως είναι η ηλεκτροφόρηση, και μέσω χρήσης κάποιων χρωστικών φθορισμού ή σε ορισμένες περιπτώσεις και με γυμνό μάτι βάσει της θολερότητας των θετικών δειγμάτων που οφείλεται στην συσσώρευση των πυροφωσφορικών. Επιπρόσθετα, ο χρόνος διεξαγωγής της LAMP κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60 λεπτών ανάλογα με το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται αλλά και τον τύπο HPV που αποτελεί στόχο της ενίσχυσης σε κάθε περίπτωση. Το γεγονός αυτό αποτελεί ακόμη ένα πλεονέκτημα της τεχνικής LAMP, εφόσον σε λιγότερο από δύο ώρες είναι δυνατή η απόκτηση μιας έγκυρης απάντησης για το αν ένα κλινικό δείγμα είναι θετικό για HPV ή όχι [162,163,164,165].

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μίας ταχύτατης, εύκολης, ευαίσθητης και υψηλής εξειδίκευσης ισοθερμικής τεχνικής (Loop-Mediated Isothermal Amplification) για την ανίχνευση των ιών HPV-16.

Για το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου αρχικά σχεδιάστηκαν τέσσερις εκκινητές, οι οποίοι στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου E6 του ιού HPV-16 με τη βοήθεια του προγράμματος Primer Explorer V4. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών

χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη αλληλουχία για το στέλεχος HPV-16. Το γονίδιο E6 επιλέχθηκε λόγω της ιδιότητάς του να διατηρείται (όπως και το E7 γονίδιο) τόσο στην επισωματική όσο και στην ενσωματωμένη μορφή του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Αντίθετα, το γονίδιο L1 το οποίο αποτελεί το πιο αυστηρά συντηρημένο γονίδιο του ιού κατά την ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή μπορεί να υποστεί θραύση κι έτσι αν στοχεύαμε σε αυτό θα ήταν πιο αυξημένη η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Το γονίδιο E7 αν και διατηρείται ανέπαφο και στις δύο μορφές του HPV ιού δεν χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών της LAMP, διότι ήταν δυσκολότερο να βρεθούν διαφορετικές αλληλουχίες στόχοι μεταξύ του HPV-16 και των υπόλοιπων τύπων HPV ιών, οπότε η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων σχετικά με τον τύπο του ιού που ανιχνεύεται θα έφθινε. Τέλος, τα υπόλοιπα γονίδια του ιού δεν χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών διότι συχνά υπόκεινται θραύση ή χάνονται κατά την ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Έπειτα, η προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αραιώσεων πλασμιδίων τα οποία περιείχαν τμήμα DNA των γονιδίων E6-E7, που είχε απομονωθεί από κυτταρικές σειρές SiHa και Caski, οι οποίες αποτελούν καρκινικές κυτταρικές σειρές προσβεβλημένες από τον HPV-16. Τελικά, οι συνθήκες που προέκυψαν μετά από αρκετές δοκιμές ήταν:

1. Επώαση στους 65ο C για 40 λεπτά, για την ενίσχυση του στόχου.
2. Επώαση στους 80 ο C για 5 λεπτά, για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Στη συνέχεια το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε σε θετικά και αρνητικά κλινικά δείγματα προκειμένου να επαληθευτεί η επιτυχία της ενίσχυσης του ιού.

Όσον αφορά στην ευαισθησία της μεθόδου αυτή προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου Real time PCR, μέσω της οποίας καταφέραμε να προσδιορίσουμε το ένα αντίγραφο χρησιμοποιώντας και πάλι τις αραιώσεις πλασμιδίων από κύτταρα SiHa και Caski και στη συνέχεια να καθορίσουμε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου LAMP το οποίο βρέθηκε ότι είναι τα 10 αντίγραφα.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος LAMP αποτελεί μια ταχύτατη, εύκολη, ευαίσθητη τεχνική , οποία διακρίνεται από υψηλή εξειδίκευση. Εκτός αυτού το κόστος διεξαγωγής της είναι αρκετά χαμηλό, καθώς ο εξοπλισμός που είναι απαραίτητος εκτός των αντιδραστηρίων της είναι ένα υδατόλουτρο, επιτρέποντας την

πραγματοποίησή της σε διαγνωστικά εργαστήρια ή ακόμη και σε πρόχειρα σχεδιασμένες μονάδες των αναπτυσσόμενων χωρών όπου τα ποσοστά των HPV λοιμώξεων είναι πολύ υψηλά. Τέλος, η LAMP μπορεί να αποτελέσει σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο τόσο για την ανίχνευση του τύπου HPV-16 όσο και άλλων τύπων HPVs αλλά πιθανόν και για άλλους παθογόνους παράγοντες.

Κεφάλαιο 5^ο

Βιβλιογραφία

1. Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* Oct;445(1-2):11-20
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* Jun 20;324(1):17-27.
3. Parkin D.M., Bray,F.I. and Devesa,S.S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer*, 37:, S4–S66.
4. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* 94:153-156.
5. Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer *N Engl J Med*.348(6):518-27.
6. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* Oct;445(1-2):224-31 *Virology*. Oct;445(1-2):224-31.
7. Zhi-Ming Zheng, Carl C. Baker (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. Sep 1;11:2286-302
8. Howley PM, Lowy DR. 2007. Papillomaviruses. In: Knipe, DM,Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2299–354
9. Agorastos T. et al. (1995) Epidemiology of human papillomavirus infection in Greek asymptomatic women. *Eur J Cancer Prev*, 4: 159-167
10. Kreider J.W. et al. (1985) Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature*, 317: 639-641
11. Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3(5):1151-1157
12. Campo S. «Papillomavirus Research: from natural history to vaccines and beyond», Caister Academic Press, England, 2006, ISBN: 1-904455-04-2
13. Danos O, Katinka M, Yaniv M 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*.;1:231–236
14. Shih-Yen Chan, H Delius, A L Halpern, and H U Bernard. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol*. 69(5):3074-83
15. Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E. & Dunn, S. T. (2006).Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J. Cancer* 118, 1071–1076
16. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70-79
17. Charles E. Wood, Zigui Chen, J. Mark Cline, Brigitte E. Miller, and Robert D. Burk 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol*. 81(12):6339-45. *J Virol*. Jun;81(12):6339-45
18. Antonsson A, McMillan NA 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol*. 87(Pt 11):3195-200 *J Gen Virol*. Nov;87(Pt 11):3195-200.
19. Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525–541

20. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, de Sanjosé S, Moreno V, Puig-Tintore LM, Smith PG, Muñoz N, zur Hausen H. 2001. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* (3):163-75
21. Kremsdorf D, S Jablonska, M Favre, and G Orth 1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *48(2): 340–351*
22. de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology Oct;445(1-2):2-10*
23. Baker T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C. and Brown, J.C. (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60:, 1445–1456.
24. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine 30 Suppl 5:F55-70*
25. Luxton J, Shepherd P, 2001. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition.
26. Yang, Francisco Martinez Murillo, Hengmi Cui, Richard Blosser, Satoshi Uematsu, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Raphael P. Viscidi, and Richard B. S. Roden, 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol. Oct;78(20):11152-60.*
27. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* (8):4818-26
28. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7.
29. Howley, P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication, p. 947-978. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa
30. Stanley M. (2008) The epidemiology and burden of HPV disease. *Nurs Times Sep 9-15;104(36):38-40*
31. Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J 21(18):4754-4762*
32. Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N, Harrison SC (2010) Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA 107(14):6298-6303*
33. Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology 445(1-2):169-174*
34. Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen, 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virol J.*
35. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA 101(39):14252-14257*
36. Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (2008) Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by 12 cross-neutralizing and 11 type-specific antibodies. *J Virol 82(9):4638-4646*
37. Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA 89(24):12180-12184*
38. Wang JW, Roden RB (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology 445(1-2):175-186*
39. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (1998) The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol 72(1):142-150*
40. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M (2002) Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol 76(19):10009-10014*

41. El Mehdaoui S, Touzé A, Laurent S, Sizaret PY, Rasschaert D, Coursaget P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. (2000) *J Virol.* Nov;74(22):10332-40
42. Demeret C, M Le Moal, M Yaniv, and F Thierry, 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.*:4777-84.
43. Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU 2002. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology.* 305(2):486-501.
44. Bernard HU (2013) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445(1-2):197-204
45. Baker CC, Howley PM (1987) Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 6(4):1027-1035
46. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49
47. Ustav M, Stenlund A 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames *EMBO J.*(2):449-57
48. Mansky KC, Batiza A, Lambert PF 1997. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol.* 10:7600-8
49. Clertant P, Seif I 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature.* 311(5983):276-9.
50. Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology* 445(1-2):35-56
51. Wilson VG1, West M, Woytek K, Rangasamy D.(2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features ,*Virus Genes.* Jun;24(3):275-90.
52. Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272(1):137-150
53. Morin G, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Berqeron –Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J (2011) A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85(11):5287-5300
54. Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J (2003) Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77(9):5178-5191
55. Sun Y, Han H, McCance DJ (1998) Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79(Pt 7):1651-1658
56. Auster AS, Joshua-Tor L (2004) The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1: Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem* 279(5):3733-3742
57. Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 74(16):7349-7361
58. White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J (2001) Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276(25):22426-22438

59. Castella S, Burqin D, Sanders CM (2006) Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res* 34(13):3731-3741
60. Hughes FJ, Romanos MA.(1993) E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* Dec 25;21(25):5817-23.
61. Eric A. Abbate, James M. Berger, and Michael R. Botchan(2004) The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* Aug 15;18(16):1981-96
62. Thorner LK, Lim DA, Botchan MR 1993 . DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol.* (10):6000-14
63. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit *J Virol.*72(9):7407-19
64. Lu JZ, Sun YN, Rose RC, Bonne W, McCance DJ (1993) Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 67(12):7131-7139
65. Lee D, Kim H, Lee Y, Choe J (1997) Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res* 52(1):97-108
66. Enemark EJ, Stenlund A, Joshua-Tor L (2002) Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *EMBO J* 21(6):1487-1496
67. Frattini MG, Laimins LA.(1994) Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;91(26):12398-402
68. Sedman J, Stenlund A. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities *J Virol.* (8):6893-7
69. Liu J.S, Kuo SR, Broker TR, Chow LT 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem.* (45):27283-91
70. Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault , Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *Biol. Chem., Vol. 278, Issue 29, 26765-26772*
71. Laimins, L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201-223. In D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
72. McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445(1-2):57-79
73. Abbate EA, Voitenleitner C, Botchan MR(2006) Structure of the papillomavirus DNA tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell.* 24(6):877-89
74. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805-809
75. Giri I, Yanin M (1988) Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7(9):2823-2829
76. McBride AA, Schlegel R, Howley PM (1988) The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* 7(2):533-539
77. Francis DA, Schmid SI, Howley PM 2000Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells *J Virol.*(6):2679-86.

78. Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM (1987) A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50(1):69-78
79. Chin MT, Hirochika R, Hirochika H, Broker TR, Chow LT (1988) Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: Functional and biochemical studies. *J Virol* 62(8):2994-3002
80. Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M (1989) Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: Structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* 63(4):1743-1755
81. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63(10):4317-4324
82. Stubenrauch F, Leigh IM, Pfister H (1996) E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* 70(1):119-126
83. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA (2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 24(10):1821-1830
84. Smotkin D and F O Wettstein 1986 Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(13): 4680-4684.
85. Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv. 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 5:1657-1671.
86. Tan SH, Gloss B, Bernard HU 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.*(2):251-6.
87. Ham J, Steger G, Yaniv M. 1994. Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.*(1):147-57.
88. Steger, G., and S. Corbach. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 71:50-58.
89. Romanczuk H, Thierry F, Howley PM 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters *J Virol.* Jun;64(6):2849-59
90. Bechtold V, Beard P, Raj K. 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* (3):2021-8
91. Sanders CM, Stenlund A (2000) Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* 275(5):3522-3534
92. McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 72:155-205
93. Zhao KN, Henqst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA, Frazer IH (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* 272(2):382-393
94. Doorbar J, Myers G (1996) The E4 protein. G Myers (Ed) *Human Papillomaviruses 1996 Compendium*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA:58-80
95. Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445(1-2):80-98
96. Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM (2011) Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol* 85(16):8080-8092

97. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH (1997) Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1 E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* 71(5):3554-3562
98. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JBA, Doorbar J (2002) Identification of a G2 arrest domain in the E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 76(19):9806-9818
99. McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J (2010) E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123(Pt 16):2810-2822
100. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P, 2004. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol.* (13):7199-207.
101. Tsakogiannis D, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Skordas V, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece.(2012) *Arch Virol.* Sep;157(9):1729-39
102. DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445(1-2):99-114
103. Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol* 79(9):5839-5846
104. Oetke C, Auvinen E, Pawlita M, Alonso A (2000) Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* 145(10):2183-2191
105. Halbert CL, Galloway DA (1988) Identification of the E5 open reading frame of human papillomavirus type 16. *J Virol* 62(3):1071-1075
106. Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM (2006) Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int* 6:19
107. Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Muller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S, Macdonald A (2012) High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol* 86(9):5341-5351
108. Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS (2010) Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol* 91(Pt 2):521-530
109. Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27(18):2532-2541
110. DiMaio D, Mattoon D (2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20(54):7866-7873
111. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10:140
112. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS (2005) E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 113(2):276-283
113. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H (2012) Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 3:152
114. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*(12):3905-10.

115. Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Bahah KO, Asnsari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S, Trave G (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* 339(6120):694-698
116. Vande Pol SB, Klingelhutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137
117. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75(3):495-505
118. Zanier K, M'Hamed Ould Sidi AO, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Trave G (2012) Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure* 20(4):604-617
119. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M (2010) *Virus Genes* 40(1):1-13
120. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDouqall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380(6569):79-82
121. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* 18(18):5061-5072
122. Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. Griep, and P. F. Lambert. 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol.* 77:6957-6964
123. Thomas M, Banks L.(1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol Jun;80 (Pt 6):1513-7*
124. Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445(1-2):138-168
125. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):2006-2011
126. Stevaux O, Dyson NJ.(2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol. Dec;14(6):684-91*
127. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO.(1990) The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol. Feb;64(2):723-30*
128. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P.(1995) Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol. Oct;69(10):6389-99*
129. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA.(2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J. May 18;24(10):1821-30*
130. Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One* 7(6):e39632
131. Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Durst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One* 8(6):e66693
132. Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI (2005) The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 158:27-34
133. Pett M, Coleman N (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212(4):356-367
134. Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One* 7(6):e39632

135. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseliov F, Durst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68(1):307-313
136. Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR, Coleman N (2007) An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J Pathol* 213(1):27-34
137. Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B (2013) Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol* 56(4):342-347
138. Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S7-S15
139. Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 118(1 Suppl):S12-S17
140. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20458-20463
141. Bergant Marusic M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L (2012) Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* 13(3):455-467
142. Caroline AJ Horvath , Gaëlle AV Boulet , Virginie M Renoux , Philippe O Delvenne , John-Paul J Bogers (2010) Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview , *Virology Journal* 7:11
143. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF (2009) Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5(2):e1000318
144. Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T (2012) The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86(6):3276-3283
145. Fay A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J. 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol.* (24):13447-54
146. Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D (2004) Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol* 72(3):478-483
147. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y (1953) The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer* 6(2):224-234
148. Richart RM (1967) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 10:748-784
149. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-2119
150. Heise A. 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19
151. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1):11-22
152. Juckett G., Hartman-Addams H.(2010) Human Papillomavirus: Clinical Manifestations and Prevention. *Am Fam Physician.* 2010 Nov 15;82(10):1209-1214.
153. Fraiser, LD et al 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360
154. Ferlay, J., F. Bray, P. Pisani, and D. M. Parkin. 2001. *GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0.* IARC Press, Lyon, France.
155. Mariani L. and Venuti A. (2010) HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of Translational Medicine*, 8: 105

156. Cutts F.T. et al. (2007) Human Papillomavirus and HPV Vaccines: a review. Bulletin of the World Health Organization, 85(9): 719-726
157. D. Tsakogiannis, C. Gartzonika, S. Levidiotou -Stefanou, P. Markoulatos (2017), Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status, Expert Reviews in Molecular Medicine, Vol. 19; e1; 1 of 20
158. Weimin Qu, Gang Jiang, Yvette Cruz, Chee Jen Chang, Gloria Y. F. Ho, Roberts S. Klein, and Robert D. Burk. (1997) PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems.
159. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. J Clin Microbiol. 44(6):2025-31
160. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004 Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. J Med Virol. 74(1):107-16.
161. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. J Virol Methods May;53(1):25-36
162. Tsakogiannis D, Diamantidou V, Toska E, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Ruether IG, Gortsilas P, Markoulatos P. (2015) Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. Arch Virol Jan;160(1):207-14
163. Chitladda Saetiew, Temduang Limpai boon, Patcharee Jearanaikoon, Sakda Daduang, Chamsai Pientong, Anusak Kerdsin, Jureerut Daduang, Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification, Journal of Virological Methods 178 (2011) 22–30
164. Masanori Hagiwara, Hajime Sasaki, Koma Matsuo, Mariko Honda, Masaaki Kawase, and Hidemi Nakagawa, (2007) Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Human Papillomavirus Type 6, 11, 16, and 18, Journal of Medical Virology 79:605–615
165. Norihiro Tomita, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda & Tsugunori Notomi, (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, Eiken Chemical Co., Ltd., Biochemical Research Laboratory, 1381-3 Shimoishigami, Ohtawara, Tochigi 324-0036
166. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000;28:e63.

